

KARIME CRUZ FRANÇA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO POR SORO URÊMICO EM CÉLULAS VASCULARES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA
2010

*Dedico este trabalho
À Deus por Sua presença constante em
minha vida.
À minha mãe e ao meu irmão, minha
pequena família, pelo amor incondicional.
Ao Peterson e sua família
pelo apoio e incentivos carinhosos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter sido a força nos momentos de fraqueza, a alegria nos momentos de tristeza e paz nas minhas angústias.

À minha orientadora, Prof. Dra. Lia Sumie Nakao, por ter sido minha “mãe científica”, sendo a base em meus primeiros passos nessa jornada. Agradeço pelos importantes ensinamentos, pela amizade e apoio, sendo a maior colaboradora na conclusão dessa etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, grande facilitador ao fornecer seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho, além do papel fundamental no meu desenvolvimento profissional como exemplo de atitude e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho, por tornar esse trabalho possível ao colaborar na obtenção dos soros de pacientes renais. Além disso, teve papel essencial através de seus conhecimentos e sua visão inovadora na pesquisa de DRC.

Aos meus pais, pela dedicação e pelos bons exemplos que iluminaram meus caminhos obscuros, para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperança.

Ao meu “brodinho”, Bruno, pela fraterna torcida. Obrigada por ter estado perto!

Ao meu namorado Peterson e sua família, pelo amor e por acreditarem na minha capacidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, em especial Silvinha, Helena, Giuseppe, Ale, Axel, Bia, Luiz e Mônica pelo convívio, disponibilidade e aprendizagem que me proporcionaram. Além do suporte técnico para a realização desse projeto, na coleta dos soros e na realização das análises.

Não posso deixar de citar os amigos do CAC, principalmente a Angela (Dire) e o Wilson, pessoas queridas que muito me entenderam.

A todos os familiares, amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FISILOGIA RENAL	1
1.1.1 Insuficiência Renal	3
1.1.2 Insuficiência Renal Crônica.....	3
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	6
1.2.1 Estresse Oxidativo e Uremia.....	10
1.3 N-ACETILCISTEÍNA (NAC)	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DOS POOLS DE SORO URÊMICO E NÃO-URÊMICO	17
3.1.1 Pool de soro de indivíduos com a doença renal crônica – urêmico	17
3.1.2 Pool de soro de indivíduos sem a doença renal crônica – não urêmico ..	19
3.1.3 Pool de soro de pacientes renais <i>versus</i> pool controle	20
3.1.4 Determinação de tióis totais nos pool de soros (urêmico e não urêmico)	20
3.1.5 Determinação de carbonilas protéicas nos <i>pools</i> de soros	21
3.2 CULTIVO CELULAR	21
3.3 EFEITO DA UREMIA NA VIABILIDADE DE RAEC E RASM	22
3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS CARBONILADAS	22
3.5 MODULAÇÃO DO TEOR DE GSH/GSSG INTRACELULAR	23
3.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE NO	24
3.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO.....	25
3.8 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL	26
3.9 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFH-DA	27
3.10 IMUNODETECÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA EM RAEC.....	28
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29

4 RESULTADOS.....	29
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POOLS DE SOROS	29
4.2 CITOTOXICIDADE DO SORO URÊMICO	33
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS	35
4.4 MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH TOTAL/GSSG INTRACELULAR	39
4.5 PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO.....	42
4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFH	47
4.7 NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO	49
4.8 DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA.....	52
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS	75
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO	75
ANEXO 2 - FICHA DE ANAMNESE.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APO - apocinina

BSA - albumina de soro bovino

Cys - cisteína

CySS - cistina

DAF-2DA - 2,7diclorodihidrofluoresceína

DAPI - 4'-diamidino-2-fenil-indol

DCFH-DA - diacetato de diclorofluoresceína

DHE - dihidroetídio

DMEM - Dubelcco's modified eagle medium

DNPH - dinitrofenil hidrazina

DTNB - dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

DTPA - ácido dietileno triamino pentacético

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

EGTA - ácido etilenoglicol tetracético

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

GSH - glutathiona reduzida

GSSG - glutathiona dissulfeto

HO• - radical hidroxila

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IL-6 - interleucina-6

LPS - lipopolissacarídeo

MTT - brometo de 3 – (4,5 dimetilazol – 2 – il) 2 – 5 difenil tetrazólio

NAC - N-acetilcisteína

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - óxido nítrico

NO₂ - nitrito

NOS - óxido nítrico sintase

NRF2- fator de transcrição nuclear 2

O₂^{•-} - radical superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

PBS - solução salina – fosfato tamponada

PFA - paraformaldeído

PTH - paratormônio

RASM - célula muscular lisa de aorta de coelho

RAEC - célula endotelial de aorta de coelho

RNS - espécies reativas de nitrogênio, do inglês, *reactive nitrogen species*

ROS - espécies reativas de oxigênio, do inglês, *reactive oxygen species*

SFB - soro fetal bovino

SN - soro não urêmico

SOD - superóxido dismutase

SU - soro urêmico

TCA - ácido tricloroacético

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RIM.....	2
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO REDOX.	8
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENTRE ÓXIDO NÍTRICO E O ÂNION SUPERÓXIDO.	9
FIGURA 4– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA DE EVENTOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DA VITAMINA D.	31
FIGURA 5 – VIABILIDADE DE RAEC.	34
FIGURA 6 – VIABILIDADE DE RASM.	35
FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EM RAEC.....	37
FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EM RASM.	38
FIGURA 9 – MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH/GSSG EM RAEC.	40
FIGURA 10 – MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH/GSSG EM RASM.....	41
FIGURA 11 – PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM RAEC.	43
FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM RASM.....	433
FIGURA 13 – ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE EM RAEC.	444
FIGURA 14 – ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE EM RASM.....	45
FIGURA 15 – DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EM RAEC.....	46
FIGURA 16 – DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EM RASM.	47
FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM RAEC.	48
FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM RASM.....	48
FIGURA 19 – ENSAIO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NITRICO EM RAEC.	50
FIGURA 20 – ENSAIO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NITRICO EM RASM.....	511
FIGURA 21 – QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA EM RAEC.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.	4
TABELA 2 – PARÂMETROS DE COLETA E DOENÇA BASE DOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA.	18
TABELA 3 – PARÂMETROS DE COLETA DOS INDIVÍDUOS SEM DOENÇA RENAL CRÔNICA.	19
TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-CLÍNICO DOS <i>POOLS</i> DE SOROS URÊMICO NÃO-URÊMICO	30

RESUMO

O acúmulo de toxinas urêmicas no plasma de doentes renais está relacionado a um estresse oxidativo sistêmico. Uma vez que a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte na doença renal crônica (DRC) e as células vasculares estão em contato direto com toxinas urêmicas acumuladas no sangue desses pacientes, o presente estudo visou investigar o papel da uremia na indução de estresse oxidativo em células vasculares, bem como o efeito do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na inibição de tal estresse e seus efeitos. *Pools* de soros humanos urêmico e não urêmico foram coletados e caracterizados. A diminuição dos níveis de tióis e o aumento nos níveis de carbonilas no soro urêmico confirmaram o estresse oxidativo sistêmico na doença renal. Células endoteliais (RAEC) e musculares lisas de aorta de coelho (RASM) foram cultivadas com 10% dos *pools*. O soro urêmico induziu um aumento de 23,5% e 25,6% na produção de superóxido após 3 e 24h, respectivamente, comparado ao soro não urêmico, determinada pela oxidação da dihidroetidina (DHE). Esta produção de superóxido está relacionada a NADPH oxidase, uma vez que a pré-incubação com apocinina, um inibidor desta oxidase, inibiu 41,5% a detecção do hidroxietídeo. A utilização da sonda MitoSox Red mostrou que mitocôndria também contribui para a produção de superóxido estimulada pelo soro urêmico em células vasculares em um período de 24 horas de exposição, aumentado em cerca de 15%. Quanto à biodisponibilidade de óxido nítrico, os resultados obtidos demonstraram que a liberação de NO esteve aumentada em células endoteliais e musculares lisas após 3 horas de tratamento (33,4%), indicados pela reação de NO produzido com a sonda DAF-2DA. Este fato sugere que o soro urêmico, nesse tempo, pode afetar a produção do NO, podendo estar relacionado ao desenvolvimento de aterogênese em doentes renais crônicos. Os efeitos crônicos da uremia no sistema de defesa antioxidante foram investigados pela determinação da razão de GSHtotal/GSSG, através do método colorimétrico por DTNB, após 3, 6 e 24 horas de tratamento. Comparado ao soro não urêmico, foi observada uma diminuição nessa razão em 6 horas de tratamento (33,4%), indicando uma queda na defesa antioxidante e um favorecimento do produto oxidado, demonstrando que a produção de radicais livres é particularmente prejudicial neste contexto. Foi verificada também a modificação de proteínas celulares na presença do soro urêmico, a primeira através de imunofluorescência indireta, no qual se observou um aumento na nitração de proteínas durante 3 e 24 horas em relação ao soro não urêmico, e na segunda através de um ensaio colorimétrico por dinitrofenil hidrazina (DNPH), no qual a produção de carbonilas protéicas também apresentou-se aumentada nos períodos de 3 e 24 horas quando expostas à uremia. Efeitos antioxidantes de NAC puderam ser observados neste estudo, uma vez que reduziu a produção de superóxido, evidente em 24 horas de exposição ao soro urêmico (81,5%), semelhantemente à apocinina, a produção de peróxido de hidrogênio (40%), de óxido nítrico (41,4%) e seus efeitos como a nitração de proteínas, bem como a carbonilação protéica (40,6%). Estes resultados confirmam o estresse oxidativo induzido pelas toxinas urêmicas, indicando alguns mecanismos envolvidos. Também, mostram que a administração de NAC é potencialmente útil na prevenção tanto de produção de ROS/RNS como na inibição dos danos oxidativos em doentes renais crônicos, sendo visto como um promissor agente terapêutico direcionado a conter complicações decorrentes da uremia.

Palavras chaves: doença renal crônica, células vasculares, estresse oxidativo, ROS, RNS, N-acetilcisteína.

ABSTRACT

The accumulation of uremic toxins in kidney failure patients plasma is related to a systemic oxidative stress. Since cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in chronic kidney disease (CKD) and the vascular cells are in direct contact with such uremic toxins, this study aimed to investigate the role of uremia in the induction oxidative stress in vascular cells, as well as the effect of antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in the inhibition of this stress and its effects. Pools of human uremic and non uremic sera were collected and characterized. The decreased levels of thiols and increased levels of carbonyls in uremic serum confirmed the systemic oxidative stress in CKD. Endothelial cells (RAEC) and smooth muscle of rabbit aorta (RASM) were cultured with 10% of the pools. Uremic serum induced an increase of 23.5% and 25.6% in superoxide production after 3 and 24, respectively, compared to non-uremic serum, determined by the oxidation of dihydroethidium (DHE). This superoxide production is related to NADPH oxidase, since the pre-incubation with apocynin, an inhibitor of this oxidase, inhibited in 41.5% the hydroxyethidium detection. The use of Mitosox Red probe showed that mitochondria also contributes to the production of superoxide stimulated by uremic serum in vascular cells. After 24 hours of exposure, Mitosox fluorescence increased by about 15%. Regarding the NO bioavailability, the results demonstrated that NO release was augmented in endothelial cells and smooth muscle after 3h of treatment (33.4%), indicated by the reaction of NO with the DAF-2DA probe. This fact suggests that uremic serum, at this time, can affect the production of NO, which may be related to the development of atherogenesis in chronic renal failure patients. The effects of chronic uremia in the antioxidant defense system were investigated by determining the ratio GSHtotal / GSSG, using the colorimetric method by DTNB, after 3, 6 and 24 hours of treatment. Compared to non-uremic serum, we observed a decrease in this ratio at 6 hours of treatment (33.4%), indicating a decrease in antioxidant defense in favor of the oxidized product, suggesting that reactive species production be particularly harmful at this time. It was verified the modification of cellular proteins in the presence of uremic serum. By indirect immunofluorescence, we observed an increased protein nitration after 3 and 24 hours in relation to non-uremic serum. And through a colorimetric assay using dinitrophenyl hydrazine (DNPH), we showed that protein carbonyl levels are increased after 3 and 24 hours in cells exposed to the uremic serum. Antioxidant effects of NAC were observed in this study. Pre-treatment with NAC reduced the production of superoxide, evident after 24h-exposure (81.5%), the production of hydrogen peroxide (40%), nitric oxide (41.4%) and the levels of protein nitration and carbonylation (40.6%). These results confirm the oxidative stress induced by uremic toxins, indicating some of the mechanisms involved. In addition, they show that NAC administration may be potentially useful both in preventing ROS / RNS production and inhibiting the resulting oxidative damage in CKD patients, which may be envisaged as a promising therapeutic agent against uremia complications.

Keywords: chronic kidney disease, vascular cells, oxidative stress, ROS, RNS, N-acetylcysteine.

1 INTRODUÇÃO

1.2 FISIOLOGIA RENAL

Os rins humanos são dois órgãos localizados na porção posterior do abdômen com cerca de 10 centímetros de comprimento e respondendo por 0,5% do peso corporal em indivíduos adultos. Embora sejam pequenos, recebem uma quantidade significativa de sangue (aproximadamente 20% do volume total) sobre o qual realizam importantes funções a fim de contribuir com a manutenção do metabolismo corporal: regulação do equilíbrio hidroeletrolítico; da osmolaridade dos líquidos corporais e das concentrações de eletrólitos; do equilíbrio ácido-básico e da pressão arterial; regulação de hormônios como eritropoietina e renina; e, principalmente, excreção de produtos da degradação metabólica e substâncias químicas estranhas ao organismo (GUYTON, 1998; ANDREOLI, 2005).

Em cada rim existe cerca de 1 milhão de pequenas estruturas denominadas néfrons, que são unidades funcionais responsáveis pela realização das funções renais, tais como excreção de toxinas, regulação hidroeletrolítica, regulação ácido-básica e funções endócrinas (ANDREOLI, 2005). Estruturalmente (FIGURA 1), são compostos por uma rede “filtrante” chamada de glomérulo, formada por mais de 50 capilares sanguíneos paralelos, a qual está envolvida por uma estrutura capsulada (denominada cápsula de Bowman) que termina em um longo túbulo especializado em realizar secreção e reabsorção. Além disso, o rim possui um sistema de capilares que são importantes para manter um fluxo sanguíneo constante através e ao redor do néfron, apesar das flutuações da pressão sanguínea (GUYTON, 1998; ANDREOLI, 2005; BRENNER, 2008).

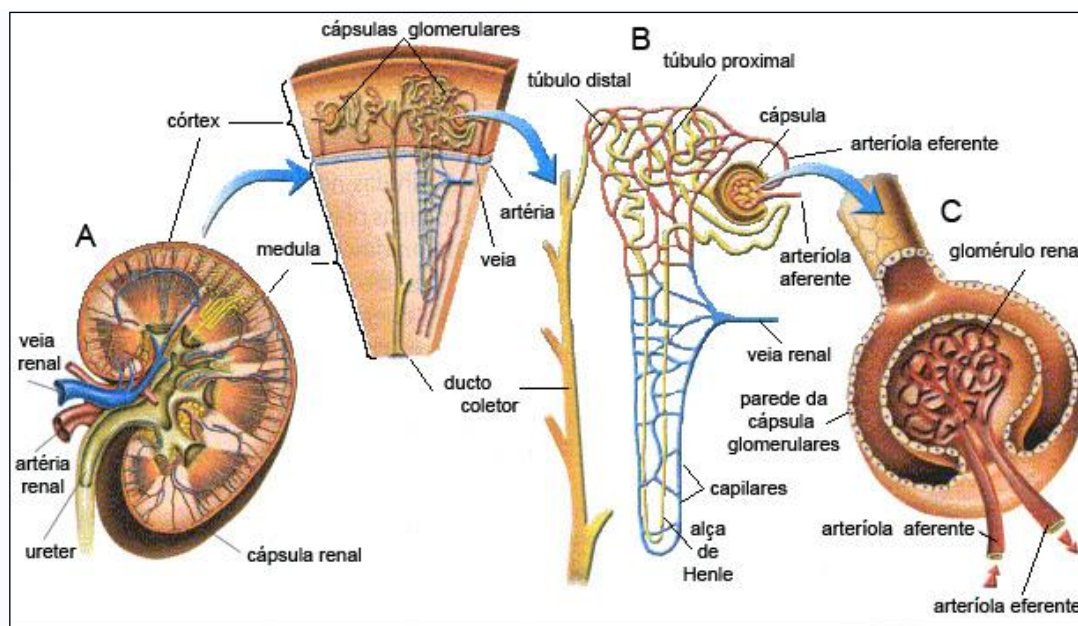


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RIM

FONTE: Adaptado de Cheida (2002).

A filtração glomerular é a primeira etapa na formação da urina. O sangue é conduzido sob alta pressão ao glomérulo através da arteríola aferente. Essa pressão (normalmente 70 a 80 mmHg) possui intensidade suficiente para que parte do plasma passe para a cápsula de Bowman, por onde as substâncias pequenas - água, sais, vitaminas, açúcares, aminoácidos e excretas - saem do glomérulo (GUYTON, 1998). O líquido que passa do glomérulo para a Capsula de Bowman é conhecido como filtrado glomerular, sendo 98% (cerca de 170 litros/dia) reabsorvido pelos túbulos renais, resultando em aproximadamente 2 litros de urina/dia. Somente não serão filtradas células sanguíneas e proteínas, por serem grandes e possuírem carga igual à barreira de filtração, respectivamente (ANDREOLI, 2005; BRENNER, 2008).

Sendo assim, o rim realiza a depuração do sangue de substâncias inúteis como produtos finais do metabolismo (uréia, creatinina, ácido úrico, sulfatos e fenóis) e também substâncias inorgânicas (íons sódio, potássio, cloreto) que se

acumulam no organismo. Este mecanismo é realizado pelo néfron através da combinação de três processos: filtração de grande parte do plasma e elementos sanguíneos não-celulares para o interior dos túbulos através dos glomérulos; reabsorção de substâncias úteis como água e eletrólitos para os capilares peritubulares, devolvendo-os para a corrente sanguínea; e por fim, a excreção dos componentes indesejáveis do sangue através do líquido resultante, a urina (BRENNER, 2008).

1.1.1 Insuficiência Renal

A insuficiência renal é conhecida como uma perda da capacidade funcional dos rins, completa ou irreversível, que leva a condições patológicas. Essa insuficiência pode ser dividida em duas categorias principais: Insuficiência Renal Aguda, na qual os rins param de funcionar de forma abrupta, por completo ou quase por completo; e a Insuficiência Renal Crônica, em que ocorre perda lenta e progressiva da função dos néfrons, diminuindo gradualmente a função renal (GUYTON, 1998).

1.1.2 Insuficiência Renal Crônica

A doença renal crônica é caracterizada pela perda da capacidade de filtração glomerular, o que causa prejuízo ao papel realizado pelos rins na manutenção do meio interno (ROMÃO, 2004). Uma característica importante da insuficiência renal crônica é o seu caráter progressivo, que leva à piora da função renal independentemente de sua causa inicial (ROMÃO, 2004; KOLAGAL, 2010). A

diminuição do número de néfrons funcionais provoca importante diminuição na excreção renal, sendo o tempo da progressão da doença bastante variável, pois depende de fatores como etiologia da lesão, aspectos étnicos, imunitários e estado hipertensivo. Além disso, a capacidade de adaptativa dos néfrons sobreviventes através de hipertrofia compensatória aumenta a taxa de filtração glomerular, mantendo a funcionalidade do rim (GUYTON, 1998). Assim, a perda de até 70% dos néfrons não é possível ser verificada clinicamente, pois não resulta em grave acúmulo de água e eletrólitos nos líquidos corporais. Sinais clínicos seguidos de terapias substitutivas da função renal, como diálise ou transplante, tornam-se inevitáveis quando o número de néfrons funcionais cai abaixo de 10%. Sendo assim, a taxa de filtração glomerular (TFG) pode ser considerada fator determinante no diagnóstico da insuficiência renal crônica conforme o grau de severidade da doença, classificando-a em cinco estágios (TABELA 1). No estágio 5 o paciente já requer diálise (LEVEY, 2005; BRENER, 2008).

TABELA 1 - ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1.73 m²)
1	Lesão Renal com normal ou aumento da TFG	≥90
2	Lesão Renal com leve redução da TFG	60–89
3	Moderada redução da TFG	30–59
4	Severa redução da TFG (Sintomas urêmicos iniciais)	15–29
5	Falência renal (Uremia grave)	<15 (ou em diálise)

FONTE: National Kidney Foundation (2002).

A sobrevida em longo prazo e a qualidade de vida de pacientes com doença renal crônica são determinadas pelas complicações que se desenvolvem durante o

curso da doença. Os fatores responsáveis por estas complicações têm sido intensivamente investigados. A fase em que começam a aparecer sintomas clínicos e anormalidades bioquímicas em um doente renal crônico é chamada de Síndrome Urêmica ou Uremia, devido ao acúmulo de produtos finais do metabolismo, neste caso consideradas toxinas urêmicas, que devem ser removidos do organismo para garantir continuamente sua normalidade metabólica (GUYTON, 1998). Neste estágio, o paciente sofre com edema generalizado, decorrente da retenção de água e solutos, acidose devido ao acúmulo de produtos ácidos gerados pelo metabolismo, aumento na concentração de nitrogênio não protéico em forma de uréia, creatinina e ácido úrico, e de outras substâncias que devem ser excretadas como fenóis, sulfatos, fosfatos e potássio (GUYTON, 1998; BRENER, 2008).

Relacionado a esta queda na taxa de filtração, apontam-se diversas patologias, dentre as quais a principal é a doença cardiovascular (YAO, 2004; LEVEY, 2005; LEHERA, 2006). Os fatores responsáveis por estas complicações têm sido intensivamente investigados. Comparado à população normal, os portadores de apresentam maior prevalência de fatores de risco tradicionais como idade avançada, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, hiperlipidemia, tabagismo, obesidade, sedentarismo e histórico familiar de doença cardiovascular (KOLAGAL, 2010). Além desses, a população de doentes renais está exposta a fatores consequentes da queda da função renal, chamados de fatores de risco “não” tradicionais como dislipidemias, estados inflamatórios e infecciosos, biodisponibilidade do óxido nítrico, calcificação vascular, anemia, disfunção endotelial, desequilíbrio iônico, tempo de diálise e estresse oxidativo (QUIJANO, 2008).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O conceito estresse oxidativo é comumente utilizado para definir um desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes (VAZIRI, 2002; AUGUSTO, 2006; VALKO, 2007) e foi introduzido pelo pesquisador Hemult Sies (SIES, 2007). Em cima deste contexto, surgiu uma terapia inovadora apontando o uso de antioxidantes no combate a doenças associadas ao estresse oxidativo, como diabetes, câncer, doenças pulmonares, cardiovasculares e neurodegenerativas (CANTIM, 2004; STOCKER, 2004; VINA., 2004; BERGER, 2005; YOH, 2008). Entretanto, contrariando expectativas, o uso de antioxidantes não se mostrou completamente eficiente na prevenção da maioria das doenças (DUIJVESTIJN, 1999; GOODMAN, 2004; LONN, 2005; WILLIAMS, 2005; ROBINSON, 2006; ORREL, 2007), sugerindo que espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) atuam como mediadores regulatórios em processos de sinalização através de reações nitroxidativas, envolvendo complexos de sistemas antioxidantes para controlar reparos ou substituir danos na maquinaria celular (JONES, 2006; VALKO, 2007). Não havendo qualquer razão para supor que estes sistemas teriam a mesma sensibilidade em responder de forma idêntica a oxidantes ou antioxidantes, uma definição alternativa para estresse oxidativo consiste em uma “perturbação na sinalização e no controle redox” (JONES, 2006).

Na verdade, concentrações insuficientes de vitamina C e E, assim como as condições que limitam a síntese de GSH e outros sistemas antioxidantes como o abastecimento de NADPH, peroxidases, e superóxido dismutases, estão associadas com o processo de doenças que podem ser beneficiadas com tipos específicos de

antioxidantes ao invés de estarem ligadas necessariamente a uma reflexão global de equilíbrio pró-oxidante ou antioxidante (JONES, 2006; VALKO, 2007; JONES 2008).

ROS e RNS quando acumuladas comprometem a integridade e funcionalidade de proteínas, lipídios, carboidratos e outras biomoléculas. Estas espécies reativas estão presentes em baixas concentrações nas células, o que torna difícil sua mensuração. Sendo assim, muitos estudos utilizam sistemas redox antioxidantes como GSH/GSSG e CyS/CySS para definir quantitativamente estresse oxidativo (JONES, 2006; VALKO, 2007). O GSH é um tripeptídeo que faz redução direta, devido ao seu resíduo de cisteína, ou indireta, através de seu ciclo redox que possui um papel catabolizador de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros peróxidos (KLEINMAN, 2000). O H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio, pode ser convertido em água pela enzima glutathione peroxidase (GSH-Px). Na reação catalisada pelo GSH-Px, o GSH é oxidado em glutathione disulfeto (GSSG), que pode ser convertida de volta em GSH pela enzima glutathione reductase (GSSG-Rd) num processo que consome NADPH (DROGE, 2002). Assim, a razão GSH/GSSG é considerada um indicador do potencial redox celular.

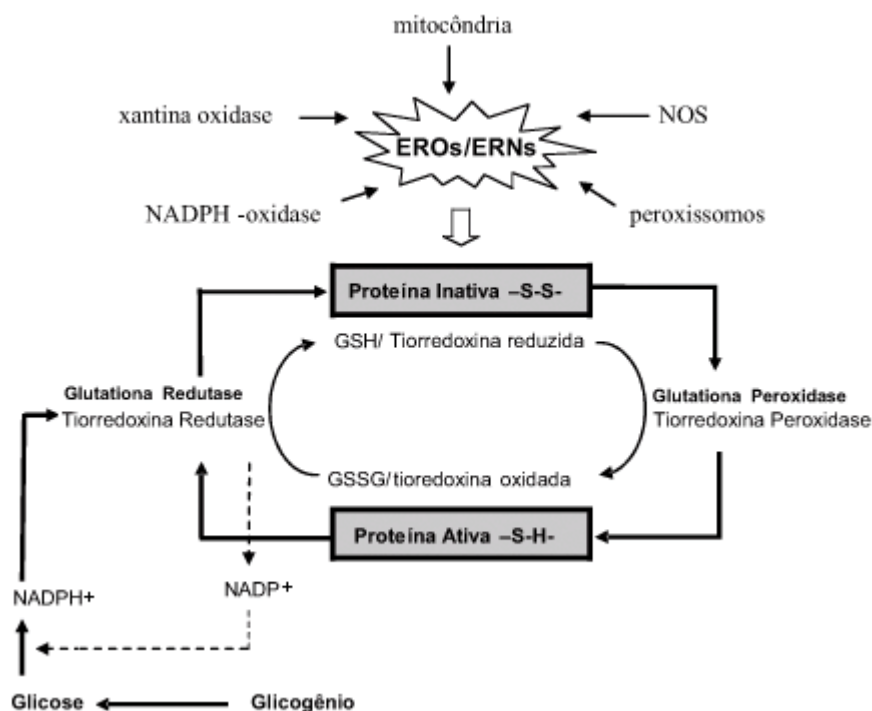


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO REDOX.

FONTE: SILVEIRA (2008)

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são bem reconhecidas tanto pelo seu papel tóxico quanto fisiológico. Em diversos tipos celulares as espécies reativas de oxigênio são geradas normalmente por regulação enzimática, como as NADPH oxidases, atuando na sinalização celular em condições fisiológicas e patológicas. As isoformas das NADPH oxidases são complexos enzimáticos responsáveis por originar ROS com papel sinalizador, estando envolvidos em várias doenças vasculares, incluindo aterosclerose, hipertensão e diabetes (TERASHIMA, 2006). Além disso, a mitocôndria também influencia a produção de ROS, envolvendo principalmente perturbações no metabolismo energético (JONES, 2006; WOSNIAK, 2009; CUPERUS, 2010). O aumento na produção de ROS (seja proveniente de um super estímulo da NADPH oxidase ou aumento do desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial) provoca alteração da regulação redox,

bastante relacionada a patologias como câncer, doença cardiovascular, aterosclerose, hipertensão, isquemia, diabetes, doenças degenerativas (Alzheimer e Parkinson), artrite reumatoide etc (VALKO, 2007).

O NO^\cdot pode apresentar um papel tanto benéfico quanto prejudicial ao organismo. É formado em tecidos biológicos por óxido nítrico sintases (NOS) específicas, sendo um radical reativo importante que atua em sinalizações oxidativas de processos fisiológicos como neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa e relaxamento de músculos lisos (HEUIL, 2002). O óxido nítrico e o ânion superóxido podem reagir e juntos produzir quantidades significantes de moléculas ativas, que também são reconhecidas como importantes moléculas sinalizadoras intracelulares por estarem envolvidas na regulação redox no interior das células, através de mediação citotóxica de células imunes efetoras ativadas, destruição de patógenos e células tumorais (HEUIL, 2002). A superprodução de RNS, ou estresse nitroxidativo, ocasiona danos oxidativos às biomoléculas, como por exemplo, fragmentação do DNA e oxidação lipídica (BRYAN, 2006; KUMAGAI, 2009). RNS também podem levar a reações de nitrosilação, que alteram estruturas de proteínas e também inibem algumas funções fisiológicas normais (VALKO, 2007). Assim, a toxicidade de NO é predominantemente ligada à sua capacidade de se combinar com ânion superóxido.

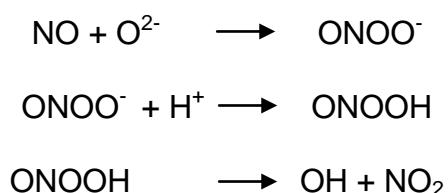


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO ENTRE ÓXIDO NÍTRICO E O ÂNION SUPERÓXIDO.

A nitração em resíduos de tirosina é amplamente usada como um biomarcador da geração de peroxinitrito (ONOO^-) *in vivo*. Neste sentido, tem sido considerada como um importante instrumento para estudo do estresse nitrosativo em doenças humanas, ainda que não seja um biomarcador específico para ONOO^- , já que a nitração também pode ocorrer por peroxidases (KUMAGAI, 2009; BONAVENTURA, 2009).

Danos oxidativos provocam fragmentação e oxidação das cadeias proteicas e consequente produção de compostos carbonilados, particularmente a partir dos aminoácidos prolina, arginina e lisina (MIYATA, 1999, HIMMELFARB, 2000), acarretando perda de suas atividades metabólicas e enzimáticas. Produtos da oxidação carbonílica estão associados a uma diversidade de patologias como doenças neurodegenerativas, diabetes, catarata e câncer (DALLE-DONNE, 2003; NYSTRÖM, 2005). Além disso, têm sido verificados acumulados no plasma e em proteínas teciduais de doentes renais crônicos, não só em estágio final, mas também no estágio de pré-diálise (MATSUYAMA, 2009; AVELES, 2010).

Estudos recentes sugerem que o aumento de compostos carbonílicos derivados de carboidratos e lipídios modificam proteínas não só por reações de glicosilação, mas também por lipoxidação (“estresse carbonílico”). Sendo assim, o conteúdo de proteínas carboniladas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse (AVELES, 2010).

1.2.1 Estresse Oxidativo e Uremia

Toxinas urêmicas consistem em um grupo heterogêneo de substâncias que sob condições normais são excretadas pelos rins, mas retidas quando esses órgãos

têm seu funcionamento comprometido (BRENNER, 2008). Uma vez que os rins não são mais capazes de eliminar compostos indesejáveis do sangue, como uréia e creatinina, a hemodiálise é descrita como uma terapia de substituição renal mecânica na qual algumas substâncias são filtradas através de uma membrana semipermeável, além de ter sido o mais importante progresso inicial no tratamento para insuficiência renal, apenas seguido por ganhos clínicos modestos ao longo do tempo (HIMMELFARB, 2009). Entretanto, este processo implica em uma visão holística quando é relacionado a atenuar consequências da uremia frente a danos causados por substâncias de baixo peso molecular, difíceis de serem removidas e que se acumulam no sangue dos indivíduos afetados (GÜNTHER, 2009; MASSY, 2009).

Uma vez que as limitações da diálise estão se tornando cada vez mais aparentes, nos últimos anos tem sido colocada em evidência a relação entre dose de diálise e melhoria da toxicidade urêmica, pois é mais complexa do que previamente pensado. Estudos recentes têm relacionado a uremia com o desenvolvimento de estresse oxidativo em doença renal crônica, sendo este intensificado de acordo com o grau da disfunção renal (AVELES, 2010; MATSUYAMA, 2009). Além disso, um dos mais significantes desafios para o campo da toxicidade urêmica é compreender como a perda da função renal intensifica o risco de doença cardiovascular (CARBO, 2008; SAGAR, 2008; GÜNTNER, 2009). Considerando a ocorrência de doenças cardiovasculares em doentes renais crônicos, as interações entre toxinas urêmicas e células constituintes dos vasos sanguíneos torna-se foco bastante importante devido ao desenvolvimento de injúria vascular (HIMMELFARB, 2009), sendo esta a principal causa de morte em

indivíduos com insuficiência renal crônica em estágio 5 (SAGAR, 2008; GÜNTNER, 2009).

Baseado nas informações anteriores, a disfunção renal está associada a um estresse oxidativo acentuado determinado no plasma de doentes renais crônicos (LOCATELLI, 2003; VAZIRI, 2004; HIMMELFARB, 2009) que podem ter uma diminuição de antioxidantes (LOCATELLI, 2003), particularmente evidenciada nos pacientes em hemodiálise (DESCAMPS-LATSCHA 2002; LOCATELLI, 2003; HIMMELFARB, 2009). Este desequilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes associado à doença renal crônica pode ser atribuído ao acúmulo de toxinas urêmicas, angiotensina II, citocinas pró inflamatórias etc (VAZIRI, 2004), que provocam consequências danosas principalmente às células que estão em contato com o plasma, como os leucócitos e as células vasculares. Tal estresse oxidativo sistêmico está relacionado com fatores de risco clássicos urêmicos e cardiovasculares, como expansão de volume, anemia, distúrbios no metabolismo de fosfato de cálcio, hiperhomocisteinemia e estado micro-inflamatório (LOCATELLI, 2003), o que pode explicar a alta incidência de complicações nestes pacientes, como inflamação crônica, aterosclerose, hipertensão, disfunção endotelial, doenças neurológicas, baixo tempo de vida dos eritrócitos e inflamação (VAZIRI, 2004). Doenças cardiovasculares são consideradas a maior causa de morte em pacientes no estágio final da doença (LOCATELLI, 2003; SERRADEL, 2003). O estresse oxidativo tem sido também associado a alguns processos fenotípicos, como apoptose e estresse do retículo endoplasmático (WERNECK, 2006). Uma elevada taxa de apoptose foi verificada nos leucócitos mononucleares de pacientes renais (GALLI, 2007), podendo este fato estar ligado ao acúmulo de toxinas urêmicas por retenção (GALLI, 2007; NIWA, 2010).

A uremia também afeta as células endoteliais e musculares lisas, através de processos inflamatórios, redox e calcificantes, os quais contribuem para a aterogênese. Por exemplo, já foi demonstrado que o soro urêmico aumenta a deposição de cálcio e a expressão de osteopontina em células musculares lisas em cultivo (CHEN, 2002). Células endoteliais cultivadas em soro urêmico apresentam uma expressão mais elevada de receptores de adesão, assim como mais secreção das moléculas de adesão solúveis, aumentando o risco de aterosclerose (SERRADELL, 2002). Células endoteliais de cordão umbilical humano, em contato com o meio urêmico por 24h, apresentaram mudanças morfológicas, maior velocidade de proliferação celular (SERRADELL, 2003). Além disso, alguns estudos relatam um aumento na liberação de óxido nítrico (NO) (THURASINGHAM, 2003), cuja oxidação por ROS pode resultar na menor biodisponibilidade de NO, podendo contribuir com a patogênese e suas consequências a longo tempo (VAZIRI, 2002).

Na fisiopatologia vascular, a participação de espécies reativas de oxigênio tem sido cada vez mais documentada. Estas espécies são produzidas principalmente pela NADPH oxidase e óxido nítrico sintases (VAZIRI, 2003), flavoenzimas que quando ativadas, catalizam um sistema transportador de elétron que doa elétron para uma molécula de oxigênio, resultando na formação de um ânion superóxido (MARTIN, 2007; HERRERA, 2010).

1.3 N-ACETILCISTEÍNA (NAC)

Perante às injúrias ocasionadas por ROS e RNS, existe um controle intracelular da produção dessas moléculas reativas através da atividade de antioxidantes, mantendo-as em baixas concentrações. Estes podem ser enzimáticos

(GSH-Px, superóxido dismutase, catalase, etc.) ou não enzimáticos como glutathione, vitaminas C e E e flavonóides (SHAIK, 2006).

Muitas intervenções farmacológicas têm sido experimentadas a fim de providenciar proteção aos danos ocasionados pelo estresse nitroxidativo. A n-acetilcisteína (NAC) vem sendo apontada como um agente atenuante de doenças sistêmicas como a insuficiência renal crônica, através de diferentes efeitos antiinflamatórios e antioxidantes (SAGAR, 2008).

N-acetilcisteína contém um grupo tiol e é utilizada terapeuticamente, há aproximadamente 5 décadas, como agente mucolítico que atua direta ou indiretamente como agente antioxidante, através da eliminação de radicais reações redox (cisteína-cistina) e da produção de glutathione (TUMUR, 2010).

A NAC é um metabólito facilmente transportado para o interior das células, onde aumenta a concentração de tióis, primeiramente de glutathione reduzida (GSH) através da sua desacetilação com consequente liberação de cisteína (CAYLAK, 2007). O fato de liberar cisteína, indica que seu mecanismo antioxidante está fortemente associado à sua propriedade de remover ROS e RNS. NAC fornece o grupamento - SH estimulando o sistema glutathione e suas enzimas, principalmente a glutathione sintetase para síntese da glutathione reduzida (GSH) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TUMUR, 2010).

Tem sido demonstrado que a NAC apresenta um efeito atenuante e até preventivo em relação aos radicais livres como, por exemplo, o ácido hipocloroso, os radicais hidroxila e o peróxido de hidrogênio (SHAIK, 2006) devido ao grupo sulfidrílico presente em sua estrutura química. Assim, a NAC pode ser parcialmente comparada à atividade de enzimas antioxidantes endógenas como a SOD, catalase

e glutathione peroxidase, apesar dessas últimas apresentarem maior capacidade de desintoxicação se comparadas a sua ação direta.

Com efeitos preventivos, NAC tem-se mostrado bastante eficiente como protetor em doença renal crônica (IVANOVSKI, 2005), câncer, insuficiência pulmonar, no tratamento da aids e outras doenças sistêmicas (NOLIN, 2010). Pode também melhorar a função endotelial e atenuar a doença inflamatória vascular (aterosclerose), antagonizando os efeitos da geração de substâncias reativas intracelulares (TUMUR, 2010). NAC também apresenta efeitos positivos sobre complicações cardiovasculares, pois as concentrações de homocisteína e lipoproteínas séricas também diminuem na presença desse antioxidante. Além disso, foi demonstrado que esta droga é capaz de aumentar a capacidade de reparo no DNA e também promove a indução da apoptose seletiva de células em transformação. Estudos também indicam que NAC reduz disfunção endotelial, inflamação e fibrose em pacientes renais crônicos, com evidente de melhora clínica (MASSY, 2009).

A NAC reduz a ativação do fator transcricional nuclear-kB (NF-kB) por bloqueio das moléculas de adesão vascular (V-CAM 1) das células endoteliais, regulando a atividade de expressão de vários genes (ZAFARULLAH, 2003). Somando-se a isso, esta droga promove o decréscimo da produção de citocinas e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) com a diminuição do estresse oxidativo e/ou aumento da SOD (CHEN, 2006).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse nitroxidativo induzido pela exposição de células vasculares ao soro urêmico, e avaliar os efeitos da N-acetilcisteína frente a este estresse oxidativo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Coleta e determinação das características urêmicas do soro de pacientes renais (estágio 5) ou pessoas saudáveis, pareados quanto à idade, sexo e co-morbidades;

2- Avaliar o estresse nitroxidativo induzido pelo soro humano urêmico em células endoteliais (RAEC) e musculares lisas (RASM) de aorta de coelho; (ROS, RNS, GSH/GSSG, carbonilas e proteínas nitradas)

3- Avaliar a capacidade do antioxidante NAC em inibir o estresse nitroxidativo induzido pela uremia em células vasculares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DOS POOLS DE SORO URÊMICO E NÃO-URÊMICO

A obtenção do *pool* de soro foi realizada em duas etapas: *pool* de soro de pacientes renais crônicos (*pool* urêmico, SU) e *pool* de soro de indivíduos não portadores de doença renal crônica (*pool* controle, SN).

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo CEP 02/08. Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1)

3.1.1 Pool de soro de indivíduos com a doença renal crônica – urêmico

A obtenção do *pool* de soro de doentes renais foi realizada na Unidade de Hemodiálise do Hospital Universitário Cajuru, em colaboração com o Dr. Roberto Pecoits-Filho.

Foram coletados soros de 29 pacientes portadores de doença renal crônica (21 homens e 8 mulheres) em estágio 5, todos submetidos à tratamento hemodialítico. A média de idade foi de $49,4 \pm 15,1$ (28 – 79 anos) e as causas da doença renal crônica foram: glomerulonefrite crônica em 13 pacientes (44,8%), nefrosclerose em 6 pacientes (24,1%) e outras etiologias em 9 outros pacientes (30,9%) conforme descrito na TABELA 2.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE COLETA E DOENÇA BASE DOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA.

Parâmetros Analisados	
Pacientes	29
Homens %	72,41%
Mulheres %	27,59
Idade (Anos)	49,4 ± 15,1
Homens /Mulheres	47,3 ± 13,0 / 52,9 ± 20,0
Tempo de Diálise (Meses)	30,6 ± 31,1
Doença de Base (%)	
Glomerulonefrite crônica	44,8
Nefroesclerose	24,1
Rim policístico	6,9
Pielonefrite obstrutiva	6,9
Uropatia obstrutiva e refluxo	6,9
Estenose congênita	3,4
Falência ou rejeição transplante	3,4
Hipertensão	3,4

FONTE: O autor (2010)

Inicialmente, foi coletado um volume de sangue periférico de 8 mL por paciente, resultando em aproximadamente 3 mL de soro. Sendo este volume de soro insuficiente para o cumprimento dos objetivos deste trabalho, os mesmos pacientes foram submetidos a duas novas coletas de sangue, de mesmo volume (8 mL), totalizando um volume final de 9 mL de soro por doador. Estas coletas foram realizadas mensalmente a fim de preservar os pacientes, uma vez que passam por coletas de sangue constantes para realização de exames rotineiros. O volume total de soro obtido foi reunido em um *pool* de soro, em um total de ± 200 mL, de onde 2 mL foram separados para futura análise bioquímico-clínica. Todas as amostras foram coletadas em jejum, de forma estéril, e na primeira sessão de hemodiálise da semana.

3.1.2 Pool de soro de indivíduos sem a doença renal crônica – não urêmico

O grupo controle foi composto de indivíduos sem doença renal crônica, diabetes, malignidade e/ou doença infecciosa recente (nos últimos 3 meses). Dentro dessas condições de exclusão, foram recrutados voluntários com características pareadas aos do grupo de pacientes renais (sexo, idade e ausência de diabetes). Sendo assim, conforme descrito na TABELA 3, foi coletado sangue de 30 indivíduos (22 homens e 8 mulheres), com uma média de idade de $43,6 \pm 11,1$ (24 – 57 anos), aleatoriamente, em um laboratório de análises clínicas, que responderam uma ficha de anamnese (ANEXO 2).

A coleta de soro nesses indivíduos seguiu o mesmo protocolo realizado nos pacientes renais, exceto a quantidade de sangue periférico extraído. Foram coletados aproximadamente 24 mL de sangue total por paciente, resultando cerca de 10 mL de soro. Este volume de soro coletado foi reunido em um *pool* de soro, em um total de ± 200 mL, de onde 2 mL foram separados para análise bioquímico-clínico. Todas as amostras foram coletadas em jejum e de forma estéril.

TABELA 3 – PARÂMETROS DE COLETA DOS INDIVÍDUOS SEM DOENÇA RENAL CRÔNICA.

Parâmetros Analisados	
Pacientes	30
Homens %	73,33%
Mulheres %	26,66%
Idade (Anos)	$43,6 \pm 11,1$
Homens /Mulheres	$46,6 \pm 9,2$ / $40,6 \pm 15,6$

FONTE: O autor (2010)

3.1.3 Pool de soro de pacientes renais *versus* pool controle

A fim de caracterizar e comparar ambos os grupos, os *pools* foram submetidos a análises de dois marcadores de estresse oxidativo: tióis livres e proteínas carboniladas. Além dessas análises, alíquotas dos *pools* foram encaminhadas ao laboratório Scribner para caracterização da síndrome urêmica, baseada em valores comparativos de compostos nitrogenados não protéicos demonstrados na TABELA 4.

3.1.4 Determinação de tióis totais nos pool de soros (urêmico e não urêmico)

A análise de tióis totais foi realizada através de um ensaio colorimétrico com DTNB (*dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)*) (HIMMELFARB, 2000). Inicialmente, 190 μL de uma solução de 0,5 mM DTNB em tampão fosfato pH 7.5 (100 mM KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, 0,5 mM DTPA) foram pipetados em 14 poços de uma microplaca. Em seguida, 10 μL de diferentes concentrações de GSH (diluídas em tampão fosfato) foram adicionados (0, 20, 50, 100, 150, 200 e 300 μM), em duplicata, com o objetivo de obter uma curva padrão. Após 10 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em 405 nm em leitor de microplaca (Bio Rad). As médias entre as replicatas foram calculadas, descontando-se o valor do branco. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras dos *pools* de soros (190 μL tampão DTNB + 10 μL amostra). As concentrações de tióis foram determinadas pela equação da reta obtida pela curva padrão e a normalização realizada pela concentração de albumina sérica.

3.1.5 Determinação de carbonilas protéicas nos *pools* de soros

Para analisar a concentração de proteínas carboniladas, a 200 μ L de cada amostra (soro urêmico ou não urêmico) foi adicionado 1 mL de solução 10 mM dinitrofenil hidrazina (DNPH, dissolvido em 2 M HCl). As amostras foram então incubadas a 37°C por 90 minutos e, após esse período, foram resfriadas em gelo. Em seguida, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 5% m/v) foi adicionado, misturado em vortex e as amostras foram centrifugadas (6000 rpm, 3 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de solução de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Tal mistura foi “vortexada” por 2 minutos e novamente centrifugada (6000 rpm, 3 minutos). Essa lavagem foi repetida duas vezes. Feito isso, o *pellet* foi ressuspensionado em solução 6 M de cloreto de guanidina e misturado em vortex por 1 minuto. Em seguida, essa solução foi centrifugada (6000 rpm, 3 minutos) e a absorbância foi determinada em 360 nm em espectrofotômetro (Meridian ELX 800). A concentração de carbonilas foi calculada utilizando o $\epsilon_{360\text{ nm}} = 21.000\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sendo os valores normalizados por mg de albumina (QUINLAN, 1999).

3.2 CULTIVO CELULAR

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) e musculares lisas de aorta de coelho (RASM) foram cedidas pela Dra. Helena Nader, Depto. Bioquímica, UNIFESP, São Paulo e cultivadas em meio F12 (Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e (10 U.I./mL) penicilina (Gibco) e (10 mg/mL)

estreptomicina (Gibco). O repique era feito a cada 3 dias, com pancreatina (Sigma). As células foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3 EFEITO DA UREMIA NA VIABILIDADE DE RAEC E RASM

As células foram cultivadas em placa de 96 poços, com um número inicial de 10.000 células, em meio F12 contendo 10% de SFB, ou 10% de SU ou 10% de SN. Após os períodos de 24, 48 e 72 horas foram submetidas ao ensaio de MTT, um método no qual redutases mitocondriais reduzem o anel tetrazólio do MTT a cristais roxos de formazan púrpura na mitocôndria das células vivas. A solubilização dos cristais por DMSO gera uma solução colorida que pode ser quantificada. O aumento da intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Para isso, as células tratadas foram lavadas com PBS e incubadas com 0,5 mg/ml MTT (Sigma), durante 4 horas. Após este período, a solução de MTT (preparada em meio DMEM (Gibco) sem vermelho de fenol) foi aspirada e as células foram lisadas com 100 µL DMSO (Bio Rad). Após homogeneização, a absorbância em 550 nm foi determinada em leitor de microplaca (Bio Rad).

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS CARBONILADAS

Como a formação de grupos carbonilas em proteínas é consequência de reações oxidativas, um ensaio de dosagem de proteínas intracelulares carboniladas foi realizado. O método utilizado é uma adaptação do método colorimétrico por dinitrofenil hidrazina (DNPH), descrito por Quinlan e Gutteridge (1999).

RAECs e RASMs (1×10^6 células) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após adesão (16h), elas foram tratadas com 2 mM de NAC (24 horas), carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. Após o tratamento, as células foram destacadas da placa, transferidas para microtubos e lisadas em 300 μ l de tampão de lise (tampão fosfato 50 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7.0) e inibidores de protease. As amostras foram centrifugadas (14.000 rpm, 15 minutos) e o sobrenadante, contendo o extrato celular, separado. Em seguida, 50 μ g de proteína/amostra foram incubadas com solução de 10 mM DNPH (em 2M HCl) (90 minutos, 37°C). O branco da reação consistiu na reação completa feita na ausência de proteínas. As absorbâncias foram determinadas em 360 nm.

3.5 MODULAÇÃO DO TEOR DE GSH/GSSG INTRACELULAR

A fim de analisar o estado redox intracelular em células expostas ao soro urêmico, foi realizada a modulação do método colorimétrico por DTNB, segundo Griffith (1980). Neste ensaio a glutathiona reduzida (GSH) é oxidada em glutathiona dissulfeto (GSSG), que pode ser convertida de volta em GSH pela enzima glutathiona redutase (GSSG-Rd) num processo que consome NADPH (GRIFFITH, 1980; RAHMAN, 2007).

RAECs e RASMs (1×10^6 células) foram plaqueadas em placas de 60 mm, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3, 6 e 24 horas. Os controles de estresse oxidativo consistiram em células cultivadas com 10% SFB na presença ou ausência de 0,5 mM H_2O_2 , durante 4 horas. Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas e o *pellet*

ressuspendido e homogeneizado em 450 µl da solução de lise (tampão fosfato 50 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7.0) e lisado por 3 ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido. As amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante separado: 50 µl para a dosagem de proteína e 350 µl para o ensaio propriamente dito. Inicialmente, para a precipitação de proteínas, foram misturados 300 µl de amostra com 300 µl de 0.5% ácido sulfosalicílico e mantidos em gelo por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas (10.000 g, 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante separado para o ensaio enzimático. A dosagem da GSH total foi determinada espectrofotometricamente (412 nm), após reação de 60 µl da amostra com 100 µl de reagente de Ellman (tampão fosfato 0,1 M, EDTA 5 mM; DTNB 0,5 mM; DTPA 0,5 mM; Glutathione Redutase 0,5 unidades/amostra; NADPH 6 mM) por 5min. Para a quantificação de GSSG, foi realizado o bloqueio da oxidação do GSH existente na amostra com vinilpiridina (2%), por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a reação de 60 µl da amostra com 100 µl de reagente de Ellman (citado acima). A quantificação do produto TNB foi feita com uma curva de calibração obtida com GSH autêntico. Os valores médios das relações GSH/GSSG estão apresentados relativamente ao valor da relação GSH/GSSG das células incubadas apenas com SFB por 4 horas.

3.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE NO

A fim de determinar a biodisponibilidade de NO em células expostas a tratamento urêmico, foi utilizado DAF-2DA (Sigma), um reagente permeável à

membrana de células vivas que em contato com NO intracelular forma um produto fluorescente (NAKATSUBO, 1998).

As células (1×10^6 células) foram plaqueadas em placas de 60 mm, pré-tratadas com 2 mM de NAC (24 horas), carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. Aos 30 minutos finais de tratamento, foi realizada a incubação das células com 10 μ M DAF-2/DA em meio livre de vermelho de fenol e de SFB. Em seguida aos 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas, mantidas em PBS (4°C) e analisadas imediatamente. A análise por citometria de fluxo (Becton Dickinson) foi realizada com excitação em 488 nm e emissão em 575 nm. Para cada amostra foi determinada a fluorescência específica de 10.000 células, representada por porcentagem de oxidação comparada ao tratamento controle (LPS 2 ug/ml, 4 horas em meio F12 contendo 10% de SFB e antibiótico) (NAVARRO-ANTOLIN, 2001; DIKSHIT, 2002).

3.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO

DHE foi utilizado para estimar a produção intracelular do ânion superóxido em RAECs e RASMs pela exposição ao soro urêmico. A dihidroetidina (DHE) é uma molécula permeável a membranas biológicas de células vivas que quando oxidada é responsável pela formação do composto fluorescente etídio e hidroxietídeo (ZHAO, 2005; ROBINSON, 2006; HAN, 2009). Segundo Zhao (2005) e Robinson (2006), a formação de EOH está associada à oxidação da DHE especificamente pelo ânion superóxido e a formação de etídio à oxidação inespecífica por outros oxidantes.

Sendo assim, validamos o produto da oxidação por DHE específica segundo Zhao (2005), adaptado.

As células (1×10^6 células) foram semeadas em placa de 96 poços, pré-tratadas com 2 mM de NAC (24 horas), carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. Aos 30 minutos finais de tratamento, foi realizada a incubação das células com 10 μ M DHE, em PBS, no escuro e a 37°C. Após os 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS, e a fluorescência dosada imediatamente em leitor de placa (Infinite M200, Tecan) com excitação em 396 nm e emissão em 580 nm (ZHAO, 2005). Em cada amostra foi estimada a fluorescência específica após 30 min de incubação com a sonda. O controle positivo da produção de superóxido foi obtido pela incubação de células com 30 mM glicose (QUIJANO, 2009) por 4 horas em meio completo. As médias das replicatas foram obtidas e comparadas relativamente à media da fluorescência das células incubadas com SFB.

3.8 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL

Sendo a mitocôndria uma fonte importante de ânion superóxido intracelular, foi realizado um ensaio com o objetivo de detectar a produção desse ânion em células tratadas com o soro de indivíduos portadores da doença renal crônica. Para isso, foi utilizado um fluoróforo indicador de superóxido mitocondrial, MitoSOX Red (Invitrogen), que é permeável à membrana de células vivas e, que ao entrar na célula, é rapidamente direcionado à mitocôndria, onde é oxidado por superóxido e emite fluorescência vermelha (HAN, 2009).

Para este ensaio, as células (1×10^4 células) foram semeadas em placa de 96 poços, pré-tratadas com 2 mM de NAC (24 horas), carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. Aos 15 minutos finais de tratamento, foi realizada a incubação das células com MitoSOX Red (1 μ M), no escuro a 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, e sua fluorescência dosada imediatamente em leitor de placa (Infinite M200, Tecan) com excitação em 396 nm e emissão em 580 nm (ZHAO, 2005). Como controle positivo da reação foi incubado 1 μ M rotenona (HAN, 2009), por 4 horas, em células cultivadas em meio completo. Os valores das médias das replicatas foram obtidos e comparados relativamente à media da fluorescência das células incubadas com SFB.

3.9 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFH-DA

DCFH-DA é convertida em DCFH dentro da célula, e tanto na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) quanto de peroxinitrito é oxidada em uma molécula fluorescente verde 2,7- diclorofluoresceína (HAN, 2009). Sendo assim, foi utilizado DCFH – DA para determinar a produção de ROS em células frente ao soro urêmico.

As células foram semeadas em placa de 96 poços e pré-tratadas com 2 mM de NAC durante 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. Aos 30 minutos finais de tratamento, foi realizada a incubação das células com 20 μ M DCFH – DA (Sigma) no escuro a 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, e a fluorescência dosada imediatamente em leitor de placa (Rchisto, Infinite M200) com excitação em 490 nm e emissão em 590 nm. Como controle da reação foi

realizada a incubação de 0,5 μM H_2O_2 , por 4 horas, em células cultivadas em meio completo. Os valores das médias das replicatas foram obtidos e comparados relativamente à media da fluorescência das células incubadas com SFB.

3.10 IMUNODETECÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA EM RAEC

Outro marcador de estresse oxidativo verificado neste trabalho foi a detecção de resíduos de nitrotirosina formados pela oxidação de resíduos de tirosina por espécies derivadas do NO (QUIJANO, 2008). O método utilizado foi o de imunofluorescência indireta.

RAECs (5×10^4 células) foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm. Após 16 horas, foram pré-tratadas com 2 mM de NAC durante 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de SU ou 10% de SN durante 3 e 24 horas. No final do tratamento, as células foram fixadas em vapor de formol durante 15 minutos e posteriormente em solução de paraformaldeído (PFA) 4%. Após a fixação das células, foram lavadas em com PBS (três vezes), glicina 0,1 M (5 minutos) e bloqueadas em solução de BSA 1% e saponina 0,01% (30 minutos). Posteriormente, foi feita a incubação do anticorpo primário anti-nitrotirosina (1: 250, Sigma), *overnight* em câmara fria. A anti-imunoglobulina de coelho conjugada com Alexa Fluor 488 (1:300, Sigma) foi utilizado para detectar a imunoreação. Por último o núcleo foi corado com DAPI e as lamínulas montadas com Fluormount (Sigma). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência (Zeiss).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram relatados em médias + SEM de 3 experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando teste *one-way* ANOVA, com pós teste de Tukey. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POOLS DE SOROS

Na doença renal crônica as funções homeostáticas renais estão comprometidas, verificando-se rápida ocorrência de graves anormalidades no volume e na composição dos líquidos corporais (GUYTON, 1998). Em caso de insuficiência renal total ocorre acúmulo de potássio, ácidos, líquidos e outras substâncias em grau suficiente para causar morte em poucos dias, a não ser que sejam realizadas intervenções clínicas, como a hemodiálise, para restaurar, pelo menos parcialmente, o equilíbrio eletrolítico (GUYTON 1998; BRENER, 2008).

A confirmação da síndrome urêmica no *pool* de soro de doentes renais, em estágio 5, foi confirmada pelos níveis aumentados dos compostos nitrogenados de baixa massa molecular, como uréia, creatinina e ácido úrico (TABELA 4), juntamente com fósforo e cálcio em relação ao soro não urêmico, resultantes da baixa taxa de filtração glomerular com conseqüente acúmulo no sangue. De fato, as concentrações séricas de creatinina e uréia são consideradas indicadoras da função renal (ANDREOLI, 2005; HIMMELFARB, 2009; NIWA, 2010).

TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-CLÍNICO DOS *POOLS* DE SOROS URÊMICO NÃO-URÊMICO.

Parâmetros	Não Urêmico	Urêmicos	Valores de referência (mg/dL)
Glicose	83,00	115,00	65,00 – 110,0
Ácido Úrico	5,80	7,40	Homem – 3,5 a 7,5 Mulher – 2,5 a 6,5
Uréia	30,1	151,4	15,0 - 40,0
Creatinina	0,77	8,83	0,40 - 1,30
Cálcio	11,11	9,89	8,5 - 10,5
Fósforo	4,17	6,50	2,50 - 5,60
Albumina	4,68	5,06	3,50 - 5,5
Colesterol Total	215,00	164,00	200 – 239
HDL – Colesterol	50	27,00	40 – 60
LDL – Colesterol	139,00	106,60	100 – 130
Triglicerídeos	130	152,00	150 – 199
Proteína “C” reativa	0,356	1,105	*Referência
Tióis totais	662uM	268um	---
Proteínas Carboniladas	0,7692 nmol/mg albumina	0,9683 nmol/mg albumina	---

*Referência: < 0,3 mg/dL para risco de doença cardiovascular
> 0,5 mg/dL para processos inflamatórios/infecciosos

FONTE: O autor (2010)

Os rins também atuam no metabolismo de fósforo e cálcio, uma vez que são responsáveis pela hidroxilação de um dos metabólitos da vitamina D, o calcidiol, para a sua forma ativa, o calcitriol (BRENER, 2008). Sendo assim, em pacientes urêmicos a síntese da conformação ativa da vitamina D torna-se comprometida, afetando as concentrações de fósforo e cálcio no sangue, já que funcionalmente regula a absorção desses minerais no intestino delgado.

O nível de fósforo no *pool* urêmico, levemente acima do referencial, está relacionado à perda da função renal ligada à queda no número de néfrons, consequentemente à diminuição da taxa de filtração glomerular, pois os rins são responsáveis pela manutenção do teor desse metabólito no corpo (BRENNER, 2008). Assim, o fósforo ao não ser excretado acumula no organismo, podendo causar sérios danos através da retirada de cálcio dos ossos. As alterações do metabolismo de fósforo e cálcio ocorrem nos pacientes com doença renal crônica muito antes do estágio de falência da filtração glomerular, pois a carência de

vitamina D estimula o desenvolvimento de hiperparatireodismo secundário renal, no qual as paratireóides produzem paratormônio (PTH) na tentativa de eliminar mais fosfato pelos rins e mobilizar cálcio dos ossos para manter a calcemia (GUYTON, 1998; BRENER, 2008), podendo determinar o acúmulo de cálcio nos rins, causando inflamação e posterior agravamento da doença por perda de néfrons, além do desenvolvimento de doenças ósseas (BRENER, 2008)

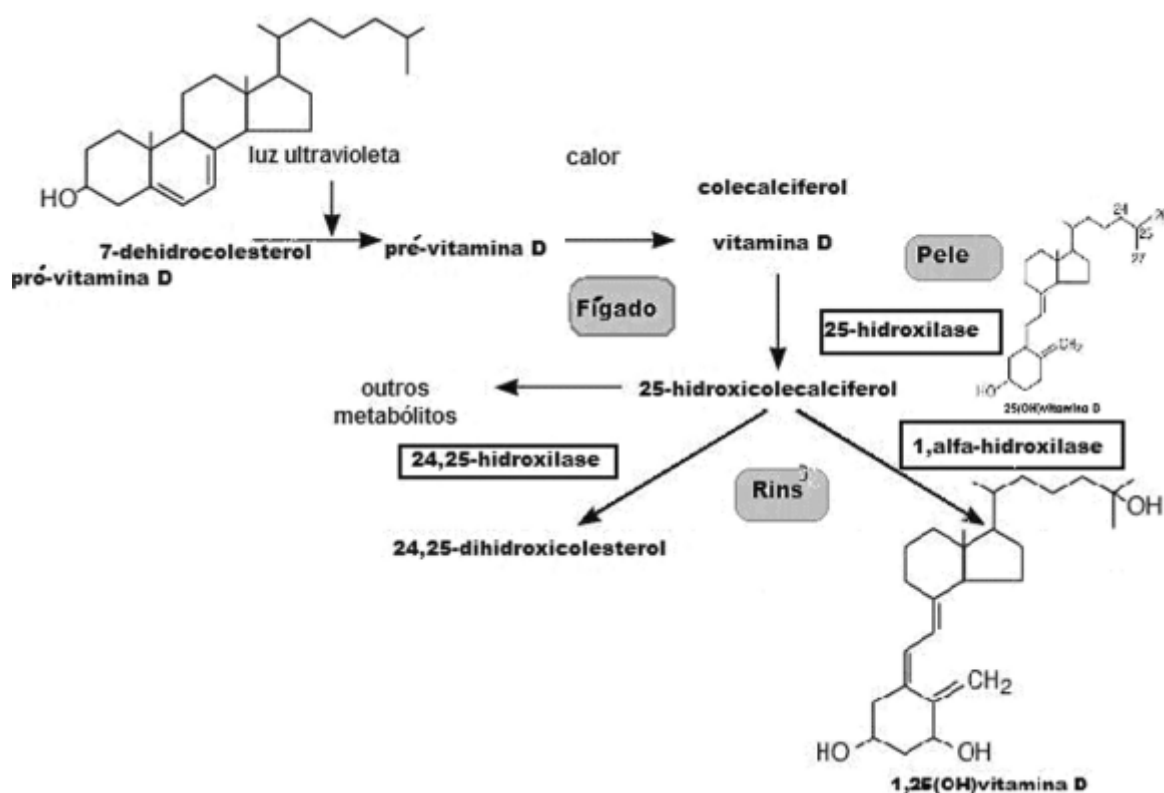


FIGURA 4– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA DE EVENTOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DA VITAMINA D.

FONTE: PREMAOR (2006)

O nível de cálcio no *pool* urêmico, quando comparado ao *pool* controle, apresentou-se dentro dos valores de referência, provavelmente pela dieta restritiva ou terapia medicamentosa com produtos à base de cálcio para correção da hipocalcemia.

Na doença renal crônica, a concentração de albumina sérica pode estar diminuída devido à queda espontânea da ingestão protéica secundária por perda do apetite, produção hepática diminuída, proteinúria maciça e o estado inflamatório urêmico (HIMMELFARB, 2004). Além disso, a albumina é uma proteína que tem sua produção inibida por atividade inflamatória, através da síntese de algumas proteínas pró-inflamatórias como a alfa-glicoproteína e outras de fase aguda como a proteína C reativa (HIMMELFARB, 2004). Entretanto, o *pool* urêmico apresentou valores dentro das referências (TABELA 3), como o *pool* controle. Isso se deve provavelmente ao fato de os doentes renais do grupo analisado passarem por recomendações nutricionais específicas para ingestão de proteínas.

A dieta dos pacientes renais pode também ter influenciado os parâmetros de lipídeos analisados, uma vez que se apresentaram menores no *pool* urêmico quando comparados ao *pool* controle. Os elevados níveis lipídicos do pool não urêmico pode estar relacionado ao fato de não terem sido excluídos portadores de doenças cardiovasculares na população de doadores. Embora os baixos níveis de colesterol associar-se à menor perda funcional dos rins, nesta análise o tratamento com estatinas realizado em pacientes com insuficiência renal, pode estar ter influenciado este resultado, uma vez que são usados como terapia farmacológica para reduzir lipídios plasmáticos nas doenças renais progressivas e assim corrigir, ou amenizar, as doenças cardiovasculares frequentemente associadas (ROSSERT, 2002; QUIJANO, 2008).

A estreita relação entre marcadores substitutos para inflamação, não convencionais, tais como os níveis plasmáticos de proteína C reativa e marcadores de oxidação lipídica em doentes renais crônicos sugerem um possível papel de inflamação (MASSY, 2009). Nossos resultados mostraram um aumento significativo

no nível da proteína “C” reativa, relacionada com a inflamação sistêmica que acompanha a doença renal crônica (HIMMELFARB, 2004; QUIJANO, 2008). Neste caso, o *pool* de soro não urêmico também apresentou um nível levemente acima do normal, provavelmente porque esse *pool* era constituído de soro de indivíduos sem insuficiência renal, mas não excluía outras doenças comuns na faixa etária estudada, como as cardiovasculares.

Além da caracterização bioquímico-clínico da síndrome urêmica, a análise de tióis totais, que atuam como antioxidantes, e proteínas carboniladas, derivadas da oxidação protéica, confirmou a presença de estresse oxidativo no plasma de doentes renais crônicos, pois os resultados mostram que o soro urêmico apresenta um nível diminuído de tióis (268 uM) e aumentado de proteínas carboniladas (0,9683 nmol/mg de albumina) quando comparado aos tióis (662 uM) e carbonilas (0,7692 nmol/mg de albumina) do soro não urêmico (TABELA 3). Compostos carbonilados derivados tanto de carboidratos quanto de lipídios, seja por rotas oxidativas ou não oxidativas, estão frequentemente aumentados no plasma de pacientes renais e reagem com proteínas levando à formação de produtos finais de glicação avançada (MIYATA, 1999). Estes dados confirmam a associação entre estresse oxidativo e uremia, como destacado pela literatura (HIMMELFARB 2009; MCMENAMIN, 2009).

4.2 CITOTOXICIDADE DO SORO URÊMICO

Uma vez que o estudo objetiva analisar o efeito da uremia sobre as células em cultura, fez-se a substituição do soro fetal bovino por soro de pacientes com doença renal (SU) ou o soro de indivíduos sem doença renal (SN). Assim, foi

analisada a possibilidade de se utilizar soro humano em substituição ao soro fetal bovino em cultura de RAEC e RASM através de um ensaio de viabilidade celular.

O ensaio mostrou que a utilização do soro humano e urêmico não afeta nem a proliferação e nem a viabilidade das células analisadas após 24 e 48 horas de tratamento. Entretanto, com 72h de exposição os dados mostraram uma significativa diferença entre os soros humanos urêmicos ou não urêmico e o soro fetal bovino, demonstrando uma provável resposta celular aos fatores de crescimento do soro humano (FIGURAS 5 e 6). Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que já está estabelecido que o soro urêmico não leva à morte por apoptose em células endoteliais de cordão umbilical humano (SERRADEL, 2003). Devido ao fato de a maioria dos trabalhos usarem 10% de soro nos meios de cultura, escolhemos a concentração de 10% para que pudéssemos comparar os dados.

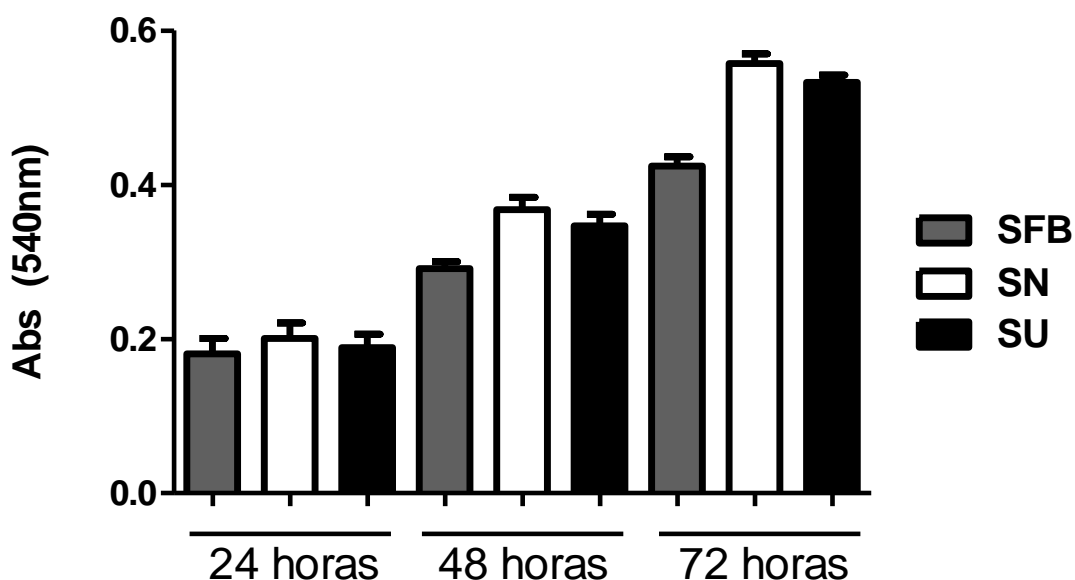


FIGURA 5 – VIABILIDADE DE RAEC.

As células foram cultivadas em meio F12 contendo antibióticos e 10% de SFB, ou 10% de US ou 10% de NS. As células foram plaqueadas (40.000 cél/poço) e submetidas ao ensaio de MTT nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento. Média de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

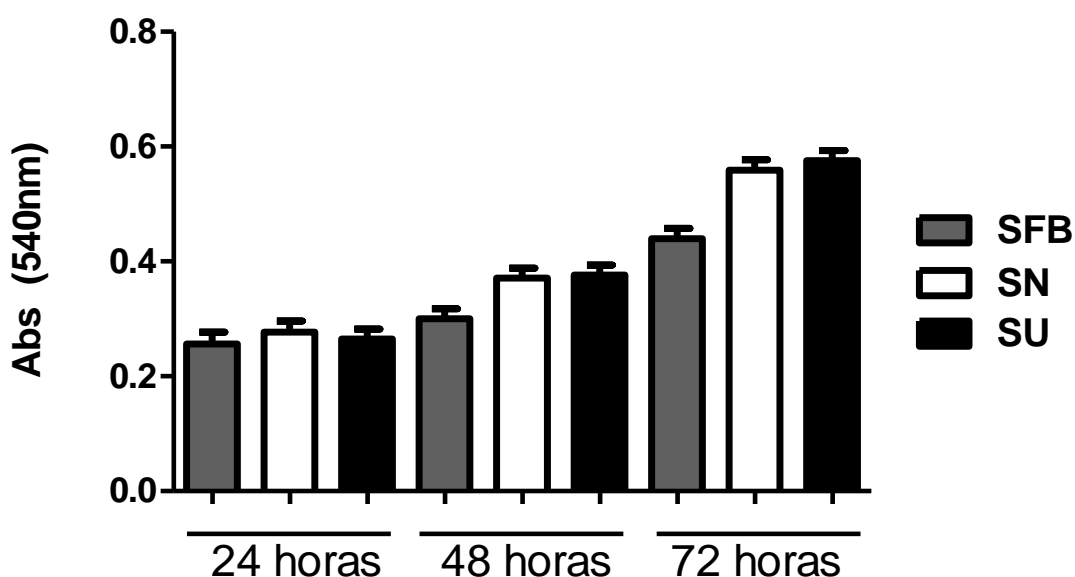


FIGURA 6 – VIABILIDADE DE RASM.

As células foram cultivadas em meio F12 contendo antibióticos e 10% de SFB, ou 10% de US ou 10% de NS. As células foram plaqueadas (40.000 cél/poço) e submetidas ao ensaio de MTT nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento. Média de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS

O entendimento dos mecanismos utilizados pelas células para manutenção do balanço redox do meio é fundamental na identificação de biomarcadores representativos para a validação do nível de estresse oxidativo de diferentes indivíduos (HIMELLFARB, 2009). Modificações químicas de proteínas têm sido observadas sistematicamente em condições patofisiológicas. A identificação de resíduos específicos e a natureza da modificação produzida são, portanto, essenciais para compreender o mecanismo de desenvolvimento de patologias (NICOLIS, 2006).

O aumento na formação de carbonilas devido à longa exposição oxidativa de lipídios, carboidratos e proteínas é associado a várias doenças como a doença renal, não somente no estágio final, mas também em estágio de pré-diálise

(AVELES, 2010). Muitos biomarcadores são encontrados em concentrações elevadas quando estão na presença da síndrome urêmica, sendo a carbonilação de proteínas um biomarcador de estresse, foi verificado o teor de carbonilas protéicas em células vasculares quando expostas ao soro urêmico.

Os resultados demonstram que a exposição durante 3 e 24 horas, tanto das células endoteliais (FIGURA 7) quanto das musculares lisas (FIGURA 8), ao soro urêmico provoca um aumento no teor de proteínas carboniladas, ao serem comparadas ao soro não urêmico. Este fato comprova que reações oxidativas podem ser disparadas nas células vasculares pela exposição ao soro urêmico. A formação de grupos carbonilas em biomoléculas pode ser resultado de reações oxidativas ou de outros caminhos bioquímicos não-enzimáticos frente à uremia (HIMMELFARB, 2009).

Além disso, células endoteliais mostraram um aumento na carbonilação de proteínas em 24 horas de tratamento com *pool* urêmico, quando comparado com 3 horas de tratamento. Este resultado confirma o papel da carbonilação de biomoléculas no desenvolvimento de complicações urêmicas à longo prazo (HIMMELFARB, 2009; AVELES, 2010).

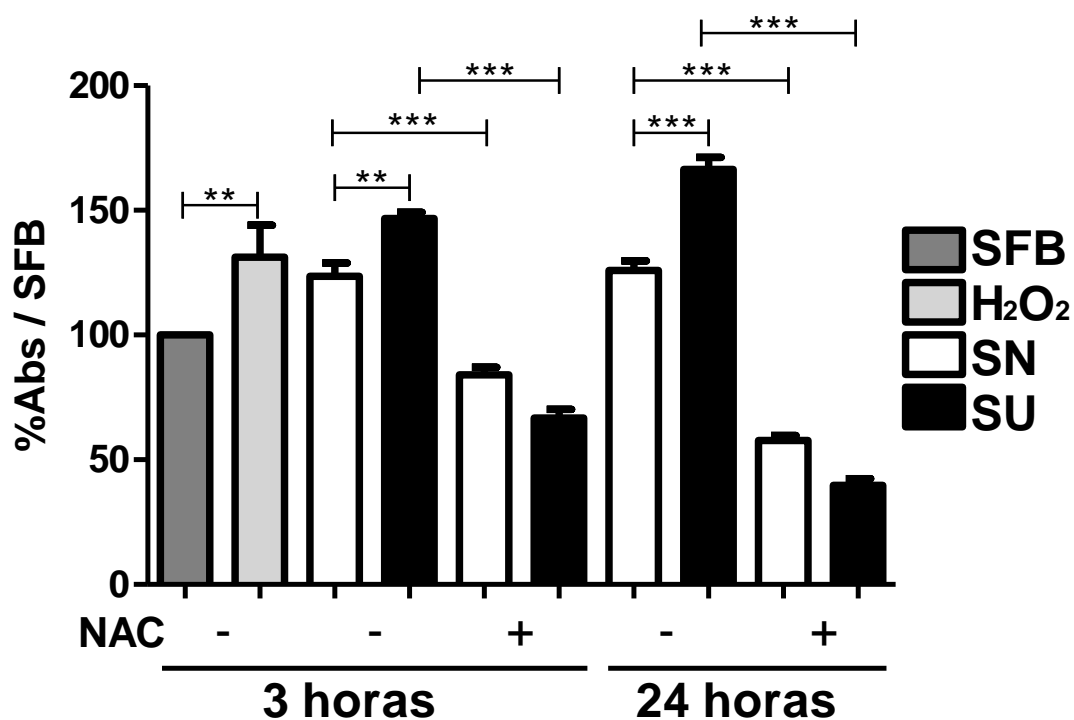


FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EM RAEC.

As células foram semeadas em placas de 60 mm, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3, 6 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 0,5 mM H₂O₂ durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas ao ensaio colorimétrico por DNPH, segundo Quinlan, 1999. Média de 3 experimentos independentes, *p<0,05.

Em células musculares lisas não ocorreu diferença no teor de proteínas carboniladas entre os tempos de 3 e 24 horas nas tratadas com o SU. Já com o SN ocorreu uma queda nesse evento, o que pode ser uma ação antioxidante enzimática (como a ação da superóxido dismutase – SOD – atuando na diminuição de ânios superóxido) ou não enzimática (como a glutatona - GSH) (VALKO, 2007; HIMMELFARB, 2009).

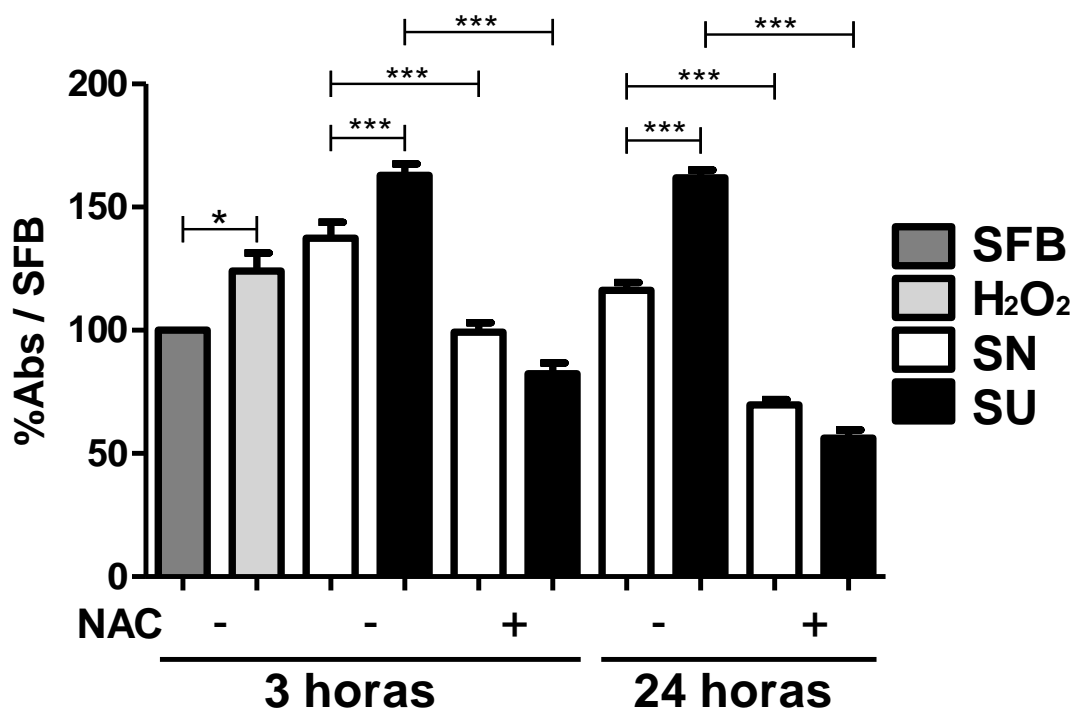


FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 60 mm, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3, 6 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 0,5 mM H₂O₂ durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas ao ensaio colorimétrico por DNPH, segundo Quinlan., 1999. Média de 3 experimentos independentes, *p<0,05.

A fim de verificar a ação antioxidante na formação de carbonilas estimulada pela uremia, foi testada a ação protetora de um precursor de GSH, a N-acetilcisteína (NAC) (TUMUR, 2010; NIGWEKAR, 2008). A hipótese de compostos antioxidantes protegerem as células pode ser comprovada através da redução dos níveis de carbonilação de proteínas, de forma rápida e duradoura, visto que esta proteção já ocorreu no período de 3h e persistiu até o tempo de análise de 24h.

4.4 MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH TOTAL/GSSG INTRACELULAR

A sinalização redox e o seu controle ocorrem através de várias vias metabólicas nas células, criando a possibilidade do estresse oxidativo perturbar o

circuito redox, fundamental para o mecanismo homeostático (JONES, 2006). O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem frequentes inter-conversões entre o estado reduzido e oxidado (BALLATORI, 2009).

O potencial redox é uma medida da tendência de espécies químicas de receber ou doar elétrons (KEMP, 2008). Na célula pode ser relacionado ao potencial de redução de uma série de pares redox acoplados presentes (KLEINMAN, 2000; LEICHERT, 2006; JONES, 2008). Dentro das células, a glutathione (GSH) é um importante tiol antioxidante e a diminuição de sua concentração intracelular é um indicador de estresse oxidativo. Existe em duas diferentes formas: a forma sulfidril reduzida (GSH) e a glutathione dissulfeto (GSSG), forma oxidada (RAHMAN, 2007). Antioxidantes intracelulares como a glutathione são doadores de elétrons, que neutralizam espécies oxidantes (SCHETTLER, 1998).

A fim de verificar a ação da uremia na indução do estresse oxidativo em células vasculares expostas ao soro de doentes renais, RAECs e RASMs foram submetidas à análise das razões GSht/GSSG. Inicialmente padronizamos as determinações de GSH total (GSht) e GSSG nas células endoteliais RAECs após a exposição aos soros durante 3, 6 e 24 horas. Os dados mostraram que em 3h de tratamento RAECs não apresentaram diferença significativa na razão GSht/GSSG (FIGURA 9).

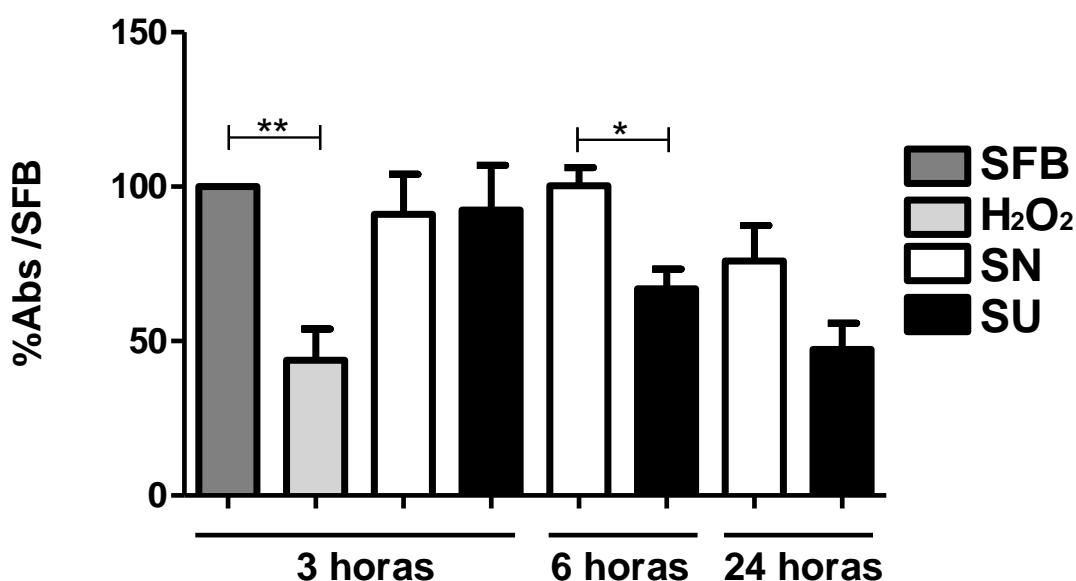


FIGURA 9 – MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH/GSSG EM RAEC.

As células foram cultivadas em placas de 60mm, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de US ou 10% de NS durante 3, 6 e 24 horas. Como controle foi utilizado FS e 0,5 mM de H₂O₂, durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas ao ensaio colorimétrico por DTNB, segundo Griffith (ANDERSON, 1980). Este resultado representa a média de 6 experimentos independentes, *p<0,05.

Em RASMs ocorreu um aumento na razão GSH/GSSG detectada nas células tratadas por 3 horas quando comparadas ao soro não urêmico (FIGURA 10), talvez demonstrando uma resposta antioxidante celular às altas concentrações de toxinas (CLERMONT, 2000; LOCATELLI, 2003; VAZIRI, 2003). Uma possibilidade é a ativação de fatores de transcrição que ativam genes de resposta antioxidantes, como o Nrf2 (ITOH, 1999; CHAN, 2001; NGUYEN, 2004).

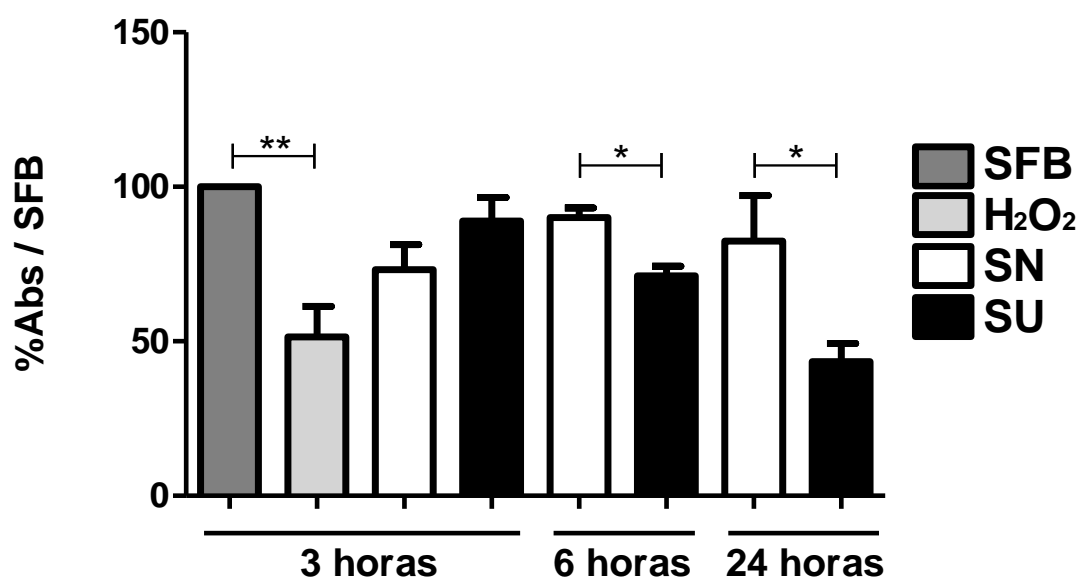


FIGURA 10 – MODULAÇÃO DA RAZÃO GSH/GSSG EM RASM.

As células foram cultivadas em placas de 60mm, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de SFB e tratadas com 10% de US ou 10% de NS durante 3, 6 e 24 horas. Como controle foi utilizado FS e 0,5 mM de H₂O₂, durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas ao ensaio colorimétrico por DTNB, segundo Griffith (ANDERSON, 1980). Este resultado representa a média de 6 experimentos independentes, *p<0,05.

Já no tratamento de 6h, verificam-se em ambas as células que a quantidade do antioxidante GSH começa a diminuir nas células perante o soro urêmico, indicando que as células não foram capazes de manter níveis normais deste por redox na presença de soro urêmico. A glutatona reduzida (GSH), o antioxidante mais importante não protéico intracelular, representa um de muitos sistemas antioxidantes naturais de defesa que inibem antecipadamente o curso da insuficiência renal crônica e o progresso da severidade da doença (SCHAFER, 2001; JONES, 2006). Em 24 horas, observa-se, tanto em RAEC como em RASM, uma queda na razão GSH/GSSG em ambos os tratamentos, entretanto mais evidente nas células tratadas com o soro urêmico, tempo suficiente de exposição que pode demonstrar um estresse oxidativo crônico observado nos doentes renais (HIMMELFARB, 2000; VAZIRI, 2004; LOCATELLI, 2003).

Assim, o estado redox GSH/GSSG mostrou variação nas células vasculares, tanto endoteliais (FIGURA 9) quanto musculares lisas (FIGURA 10), confirmando ser a glutathione alvo importante da uremia, como consequência, desbalanço na sinalização celular (JONES, 2006).

4.5 PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO

O ânion superóxido é formado pela redução do oxigênio molecular (O_2). Este processo é mediado por enzimas como NADPH oxidase e xantina oxidase ou por reações da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (DRÖGE, 2002; ZHAO, 2005; ROBINSON, 2006). Para melhor esclarecer a capacidade de o soro urêmico estimular a produção de superóxido em células vasculares, foi testada oxidação do DHE em RAECs e RASMs em cultura, através da quantificação de produtos fluorescentes, especificamente pela formação do composto fluorescente Etidio (OH).

Os resultados demonstraram que o soro urêmico levou a um aumento nos níveis de superóxido em 3 horas de tratamento em células endoteliais (FIGURA 11) mais evidente que em células musculares lisas (FIGURA 12). Entretanto, em 24 horas de exposição, ambas as células demonstraram um significativo aumento na produção de superóxido quando comparada ao SN. Já frente ao SU, em 24 horas, RASM apresentou um aumento mais evidente do ânion que RAEC.

Nesse ensaio, também foi observado o papel antioxidante de NAC, que se mostrou eficiente ao inibir a produção do ânion superóxido em células expostas ao soro urêmico tanto em células endoteliais quanto em células musculares lisas, principalmente quando sujeitas a 24 horas de tratamento.

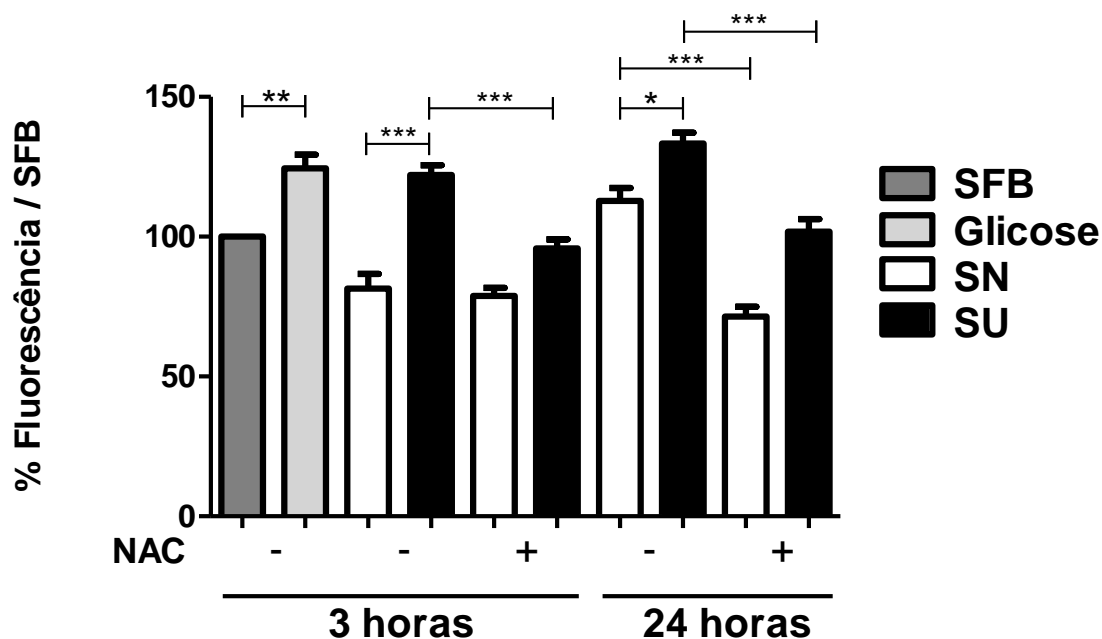


FIGURA 11 – PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM RAEC.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM Glicose, durante 4 horas. Em seguida, foram incubadas com DHE (10uM) por 30 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, *p<0,05.

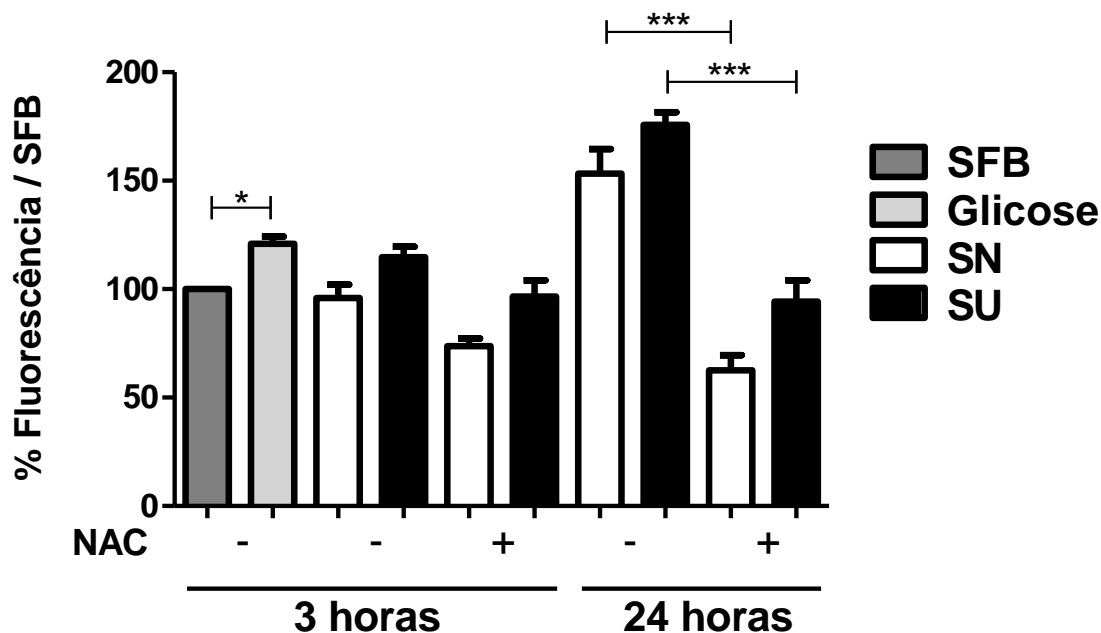


FIGURA 12 – PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM Glicose, durante 4 horas. Em seguida, foram incubadas com DHE (10uM) por 30 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, *p<0,05.

Em células vasculares, tanto em RAEC quanto em RASM (FIGURAS 13 e 14), NADPH oxidase tem sido bastante apontada como sendo a principal fonte de ânion superóxido, atuando como um importante agente sinalizador redox (KUMAGAI, 2009; WOSNIAK JR., 2009; HEUMÜLLER, 2010). Para verificar se o superóxido produzido foi produto da ativação de NADPH oxidase, o mesmo ensaio foi realizado, mas substituindo NAC por apocinina (Sigma) (20 μ mol/L), um inibidor de NADPH oxidase (HEUMÜLLER, 2010). O resultado comprova o fato de a NADPH oxidase ser uma das principais origens de superóxido em células vasculares a partir da sua exposição a toxinas urêmicas, já que a apocinina apresentou um efeito semelhante ao NAC ao inibir a produção de superóxido nessas células. Logo, NAC pode estar atuando na via de produção de superóxido relacionada a NADPH oxidase (ZAFARULLAH, 2003).

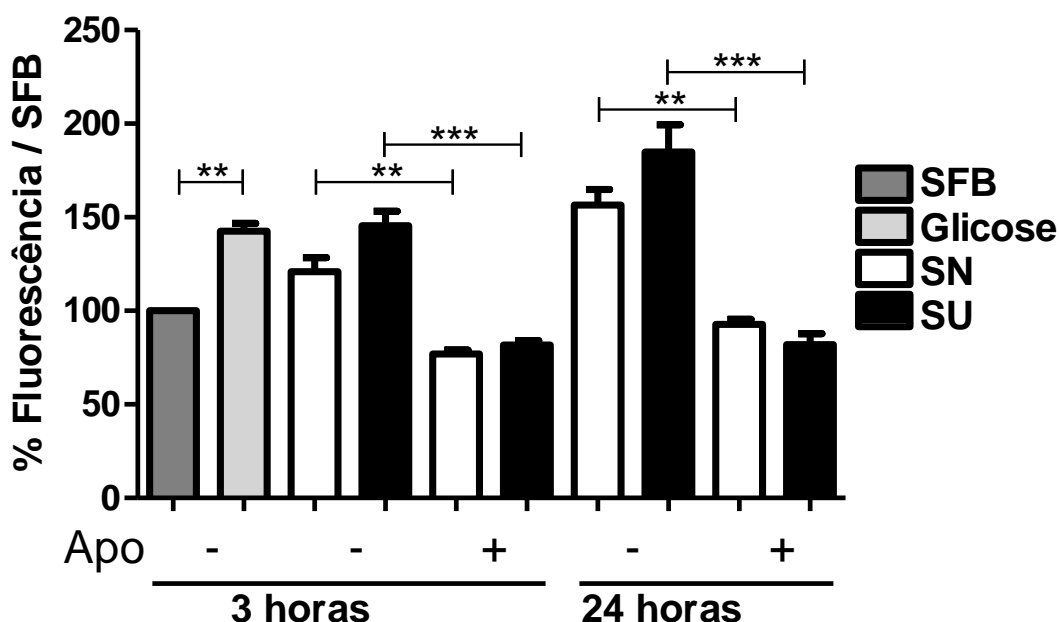


FIGURA 13 – ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE EM RAEC.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM glicose, durante 4 horas. Em seguida, foram incubadas com apocinina (20 μ mol/L) e logo após com DHE (10 μ M) por 30 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, *p<0,05.

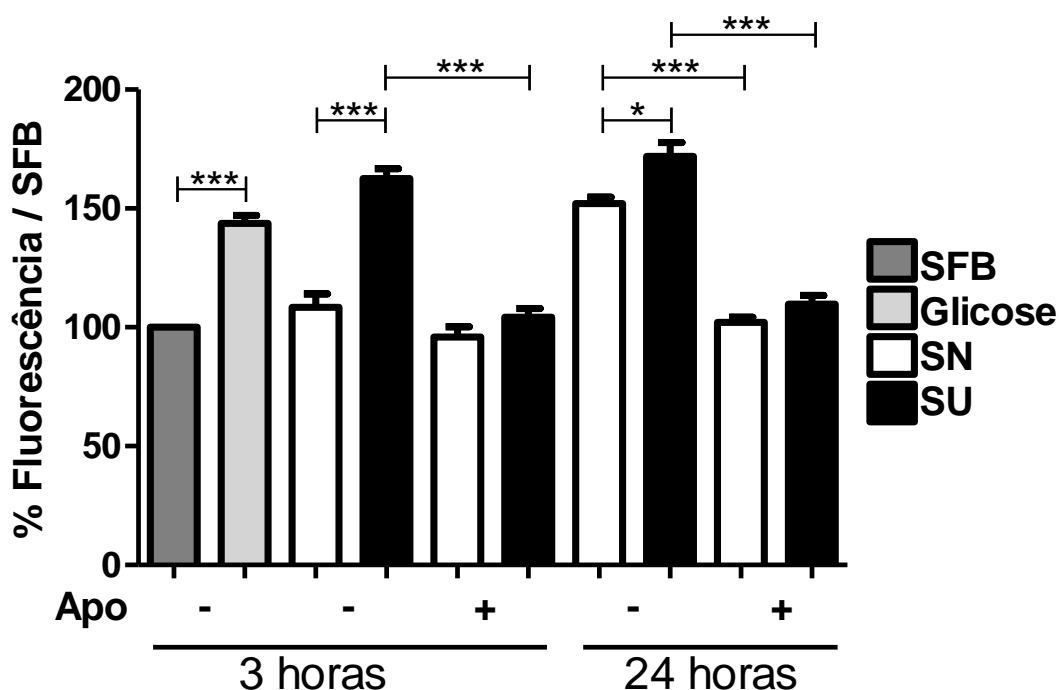


FIGURA 14 – ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM glicose, durante 4 horas. Em seguida, foram incubadas com apocinina (20 $\mu\text{mol/L}$) e logo após com DHE (10 μM) por 30 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

Outra origem de ânion superóxido é a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (JONES, 2008), como subproduto do metabolismo normal durante a conversão do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O). A transferência de um elétron para o oxigênio pela citocromo C oxidase e flavoenzimas resultam na produção de superóxido (HAN, 2009). Sendo assim, foi verificado se a produção deste ânion em células expostas ao soro urêmico pode ter sido influenciada pelo metabolismo mitocondrial através da utilização de MitoSOX Red, uma sonda com direcionamento mitocondrial que é oxidada semelhantemente ao DHE.

Foi constatado que a partir de 24 horas de exposição ao soro urêmico ocorre uma aumento na produção do ânion superóxido tanto em RAEC (FIGURA 15) quanto em RASM (FIGURA 16), levando a considerar a mitocôndria como sendo contribuinte na

produção de ROS em um estágio não tão precoce da exposição a uremia. Foi observada também mais uma vez a ação protetora de NAC ao reduzir os níveis de superóxido perante o soro urêmico, reforçando que a utilização desse agente como terapia medicamentosa é eficiente na neutralização de ROS em células vasculares (NIGWEKAR, 2009).

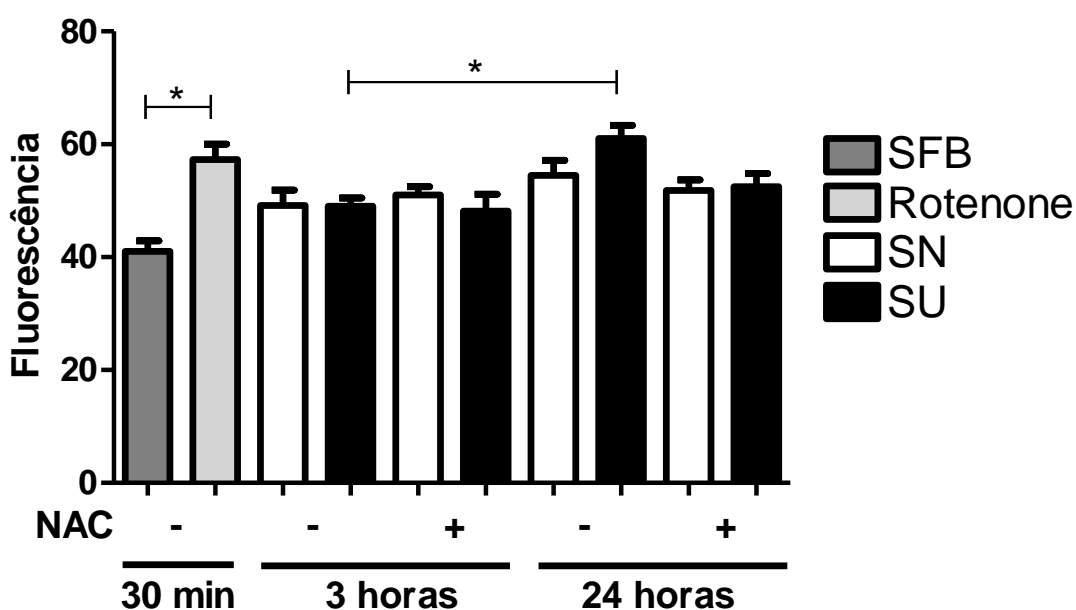


FIGURA 15 – DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EM RAEC. As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM Rotenona, durante 30 minutos. Em seguida, foram incubadas com MitoSOX Red (1 μ M) por 15 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

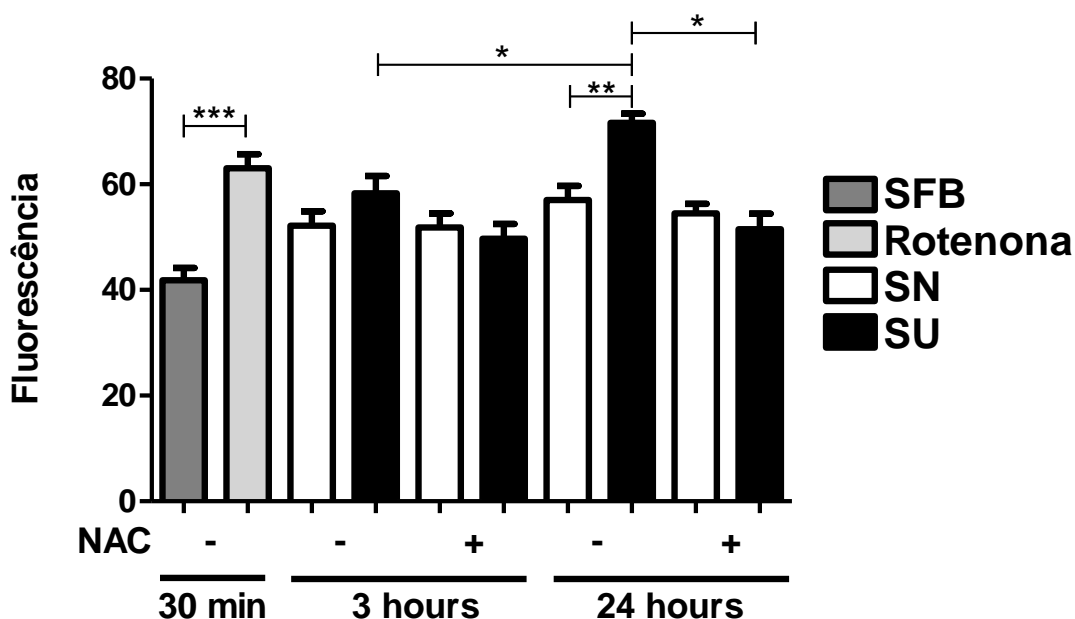


FIGURA 16 – DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 30 mM Rotenona, durante 30 minutos. Em seguida, foram incubadas com MitoSOX Red (1 μ M) por 15 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFH

O peróxido de hidrogênio também é um marcador de estresse nitroxidativo, uma vez que é derivado do ânion superóxido quando convertido pela enzima SOD (VALKO, 2007). Esta substância pode ser convertida a radicais hidroxila, via reação de Fenton, que são altamente reativos e contribuem com a degradação de biomoléculas orgânicas (MASSY, 2009). Neste estudo, foi possível observar que a produção de peróxido de hidrogênio mostrou-se elevada em RAECs (FIGURA 17) em 24 horas quando expostas ao soro urêmico. Por conseguinte, este mesmo aumento também foi possível ser observado em RASMs (FIGURA 18), sendo esta elevação estatisticamente significativa neste caso.

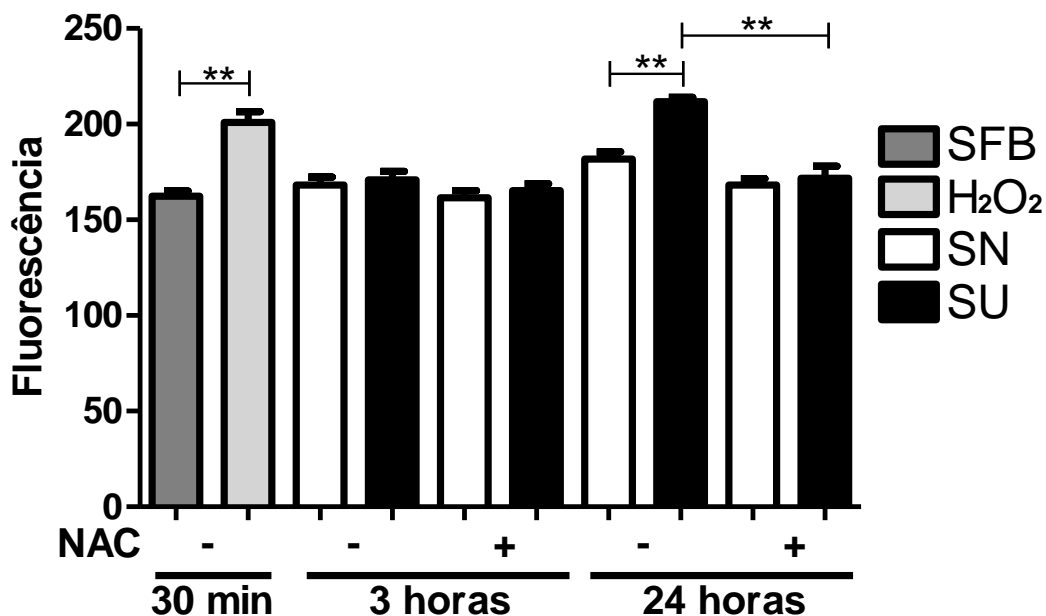


FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM RAEC.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de FS e tratadas com tratadas. Como controle da reação foi utilizado 0,5 mM H₂O₂, durante 4 horas. Em seguida, foi obtida a fluorescência equivalente às células tratadas FS e, após os 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS, e analisadas imediatamente em leitor de placa (Rchisto, Infinite M200) com excitação em 396 nm e emissão em 580 nm. Este resultado representa a média dos valores de 5 experimentos independentes, *p<0,05.

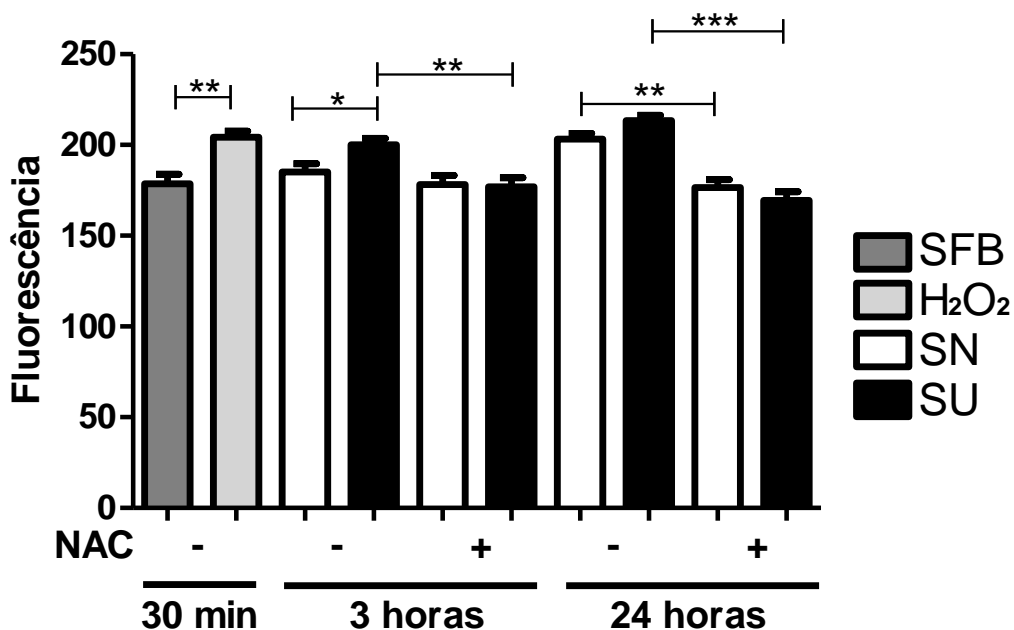


FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de FS e tratadas com tratadas. Como controle da reação foi utilizado 0,5 mM H₂O₂, durante 4 horas. Em seguida, foi obtida a fluorescência equivalente às células tratadas FS e, após os 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS, e analisadas imediatamente em leitor de placa (Rchisto, Infinite M200) com excitação em 396 nm e emissão em 580 nm. Este resultado representa a média dos valores de 5 experimentos independentes, *p<0,05.

4.7 NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico, biologicamente formado na conversão de L-arginina à L-citrulina pela óxido nítrico sintase (NOS), é um importante mediador de uma variedade de processos fisiológicos (BRYAN, 2006). Entretanto, as espécies derivadas do NO podem gerar uma variedade de ROS e RNS, também considerados importantes moduladores de funções celulares e teciduais. Contudo, algumas delas, como o peroxinitrito, produzido pela rápida reação entre o NO e o ânion superóxido pode causar danos à biomoléculas e contribuir com o desenvolvimento de condições patofisiológicas ao ambiente em que se encontram (THURASINGHAM, 2003). Pelo fato de a insuficiência renal crônica estar associada a um estresse oxidativo sistêmico ocasionado por ROS e RNS (HIMELFARB, 2009), foi avaliado a biodisponibilidade do NO causada pela presença de toxinas urêmicas em cultura de RAEC e RASM.

Os dados obtidos mostram que ocorre um aumento na produção de NO pelo soro urêmico durante 3h de exposição, ao SU quando comparado ao SN, em ambas as culturas de células vasculares, sendo mais evidente nas células endoteliais (FIGURA 19) que em células musculares lisas (FIGURA 20).

Quanto às células que receberam o pré-tratamento com NAC, ocorreu uma redução nos níveis de NO nos períodos de 3 e 24 horas quando comparados aos valores das células não tratadas, em ambos os tipos celulares. Esta redução mais uma vez mostrou a ação do NAC como inibidor de produtos do estresse oxidativo ocasionado pela uremia. Tem sido descrito que a reação do NO com tióis pode prevenir o acúmulo de peroxinitrito em níveis tóxicos (MASSY, 2009).

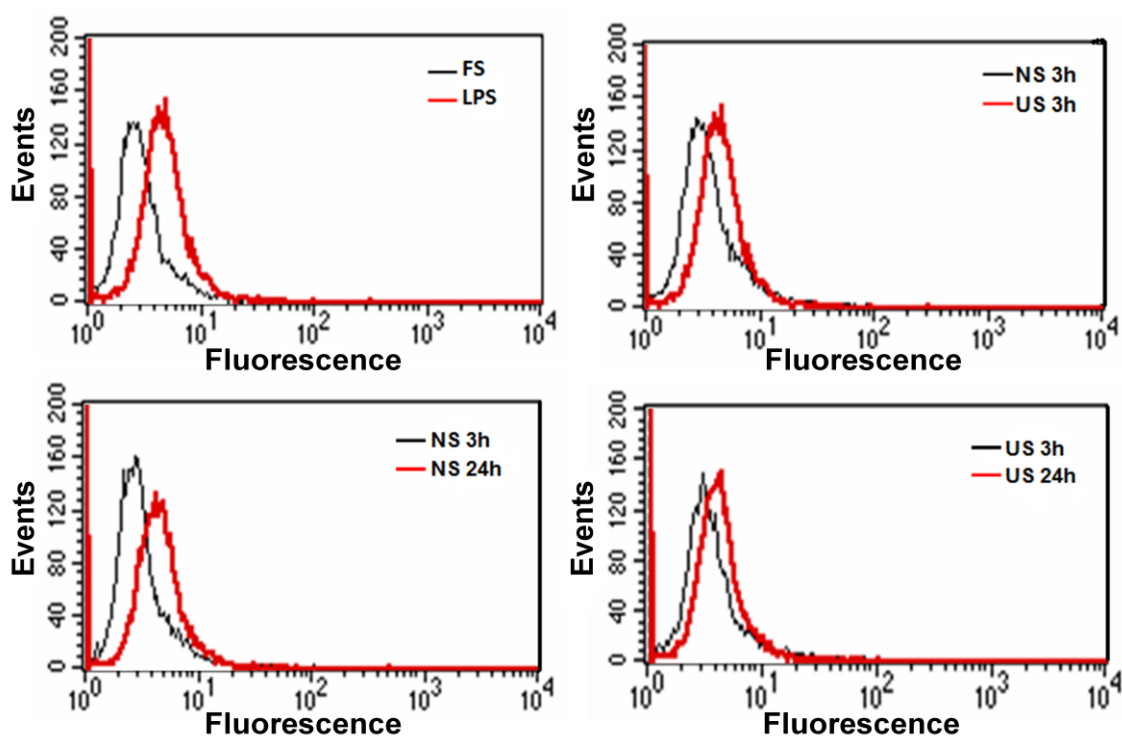
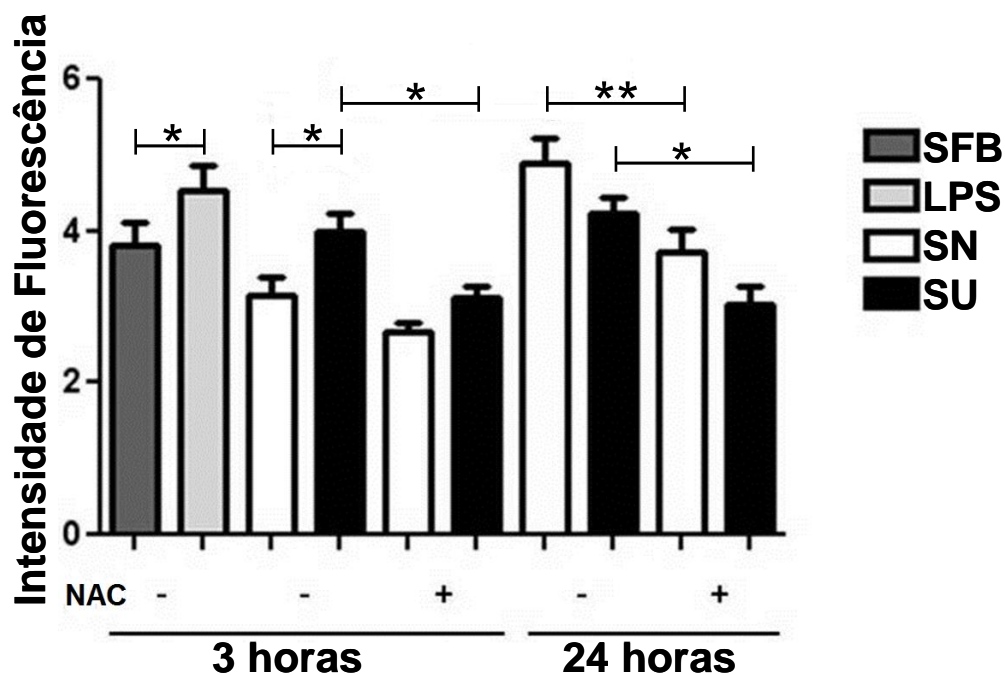


FIGURA 19 – ENSAIO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NITRICO EM RAEC.

As células foram semeadas em placas de 60mm, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5% de FS e tratadas com 10% de US ou 10% de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10 % de FS ou 2 ug/ml LPS, durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas a análise por citometria de fluxo foi realizada com excitação de 488nm e emissão de 575nm. Em cada amostra foi estimada a fluorescência específica de 10.000 células. Este resultado representa a média dos valores de 5 experimentos independentes, *p<0,05.

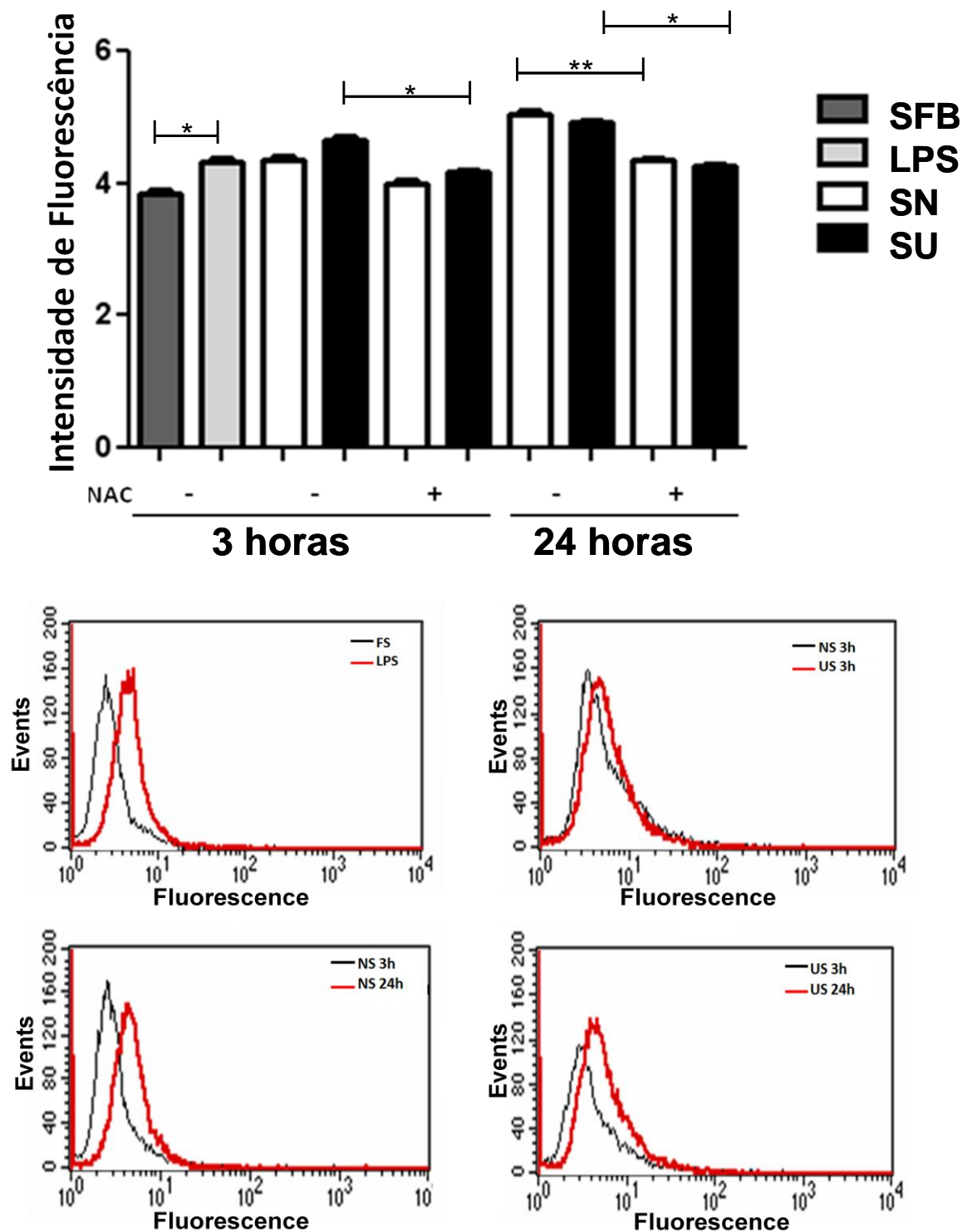


FIGURA 20 – ENSAIO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NITRICO EM RASM.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, pré-tratadas com NAC (2 mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 0,5 mM H_2O_2 , durante 4 horas. Em seguida, foram incubadas com DCFH - DA (10uM) por 30 minutos e submetidas à excitação de 396 nm e emissão de 580 nm. Este resultado representa a média de valores de 6 experimentos independentes, * $p < 0,05$.

4.8 DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA

A superprodução de ROS e RNS é chamada de estresse nitroxidativo, ou seja, quando ocorre um desequilíbrio na formação dessas espécies em favor dos oxidantes, com consequente dano (NICOLIS, 2006; VALKO, 2007; VAZ, 2008). Sendo as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tipicamente responsáveis por modificações protéicas através da formação de espécies oxidantes (NICOLIS, 2006), muitos estudos têm utilizado tais alterações como biomarcadores de estresse.

O óxido nítrico pode reagir com ânion superóxido para formar peroxinitrito e este último com resíduos tirosil de proteínas para formar nitrotirosina, ou com tióis em proteínas ou em glutatona para formar S-nitrosotióis (MASSY, 2009). Assim, a nitração de tirosina em proteínas vêm atraindo considerável atenção devido à sua capacidade potencial de alterar a função protéica, indicando estados de doença aguda e crônica, podendo também funcionar como marcador para risco de doença (VALKO, 2007; VAZ, 2008).

Quanto a marcação de resíduos de tirosina presentes em células tratadas com soro urêmico, foi possível observar o efeito deste processo em células endoteliais expostas ao soro de pacientes renais crônicos (FIGURA 19), demonstrando que as toxinas urêmicas danificam potencialmente proteínas intracelulares em células vasculares, sendo bastante evidente em 24 horas de exposição. Foi possível verificar que o NAC reduziu a nitração de proteínas em células não tratadas como nas células tratadas com NAC, tanto em 3 quanto em 24 horas. Tanto na injúria aguda como na crônica, muitos sistemas antioxidantes intra e extracelulares tornam-se esgotados, levando a um aumento no estresse oxidativo.

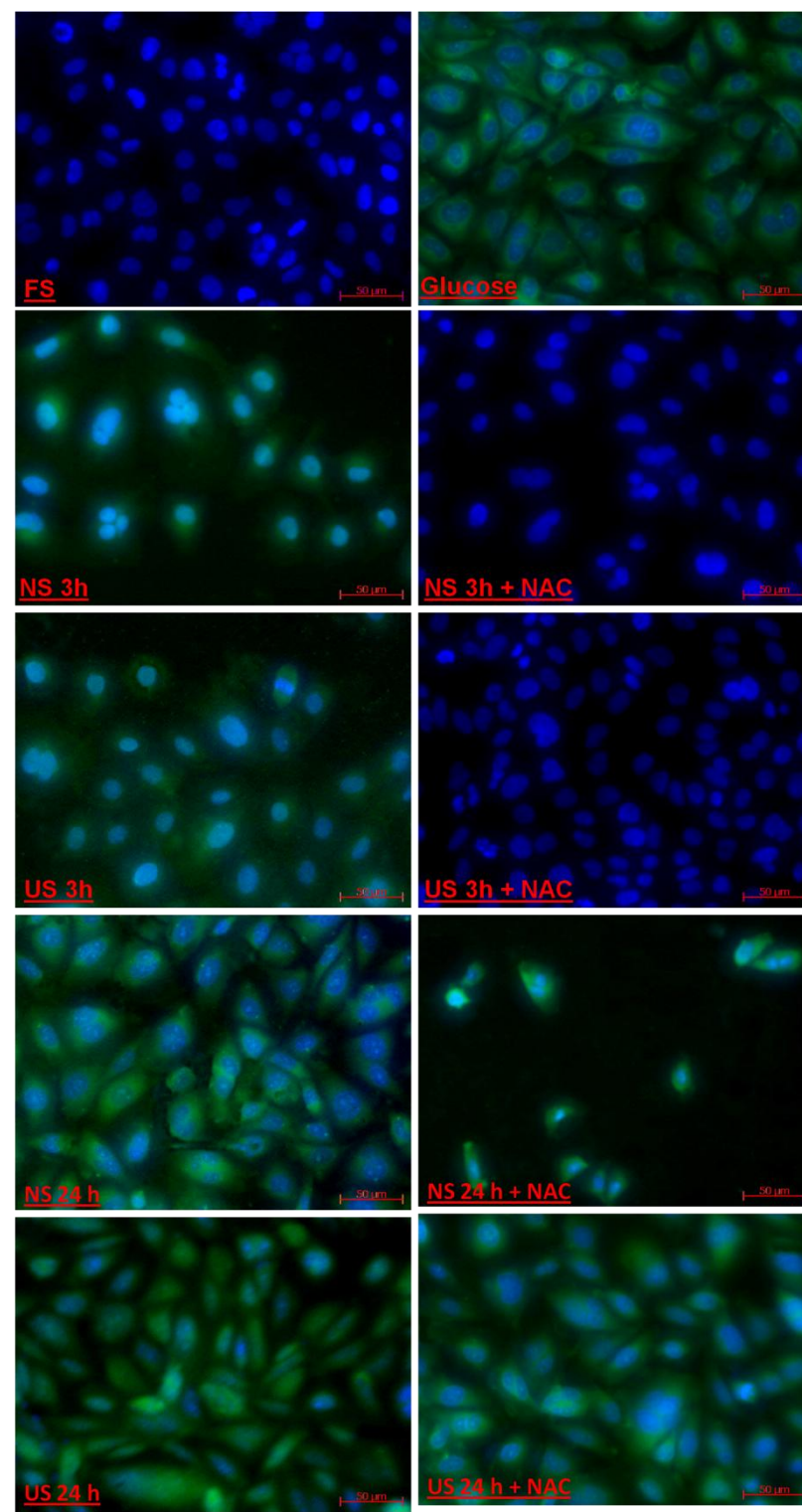


FIGURA 21 – QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE NITROTIROSINA EM RAEC.

As células foram semeadas em lamínulas de 13mm, pré-tratadas com NAC (2mM) por 24 horas, carenciadas durante 16 horas com 0,5 % de FS e tratadas com 10 % de US ou 10 % de NS durante 3, 6 e 24 horas. Como controle foi utilizado 10% de FS ou 0,5 mM H_2O_2 durante 4 horas. Em seguida, foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta com anti-nitrotirosina (1:250) e Alexa 488 (1:300). Resultado consistente com 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Em resposta à crescente evidência de que o estresse nitroxidativo está ligado à muitos processos patológicos vasculares, a validação de estudos tem sido bastante importante neste sentido a fim de determinar as origens e agentes antioxidantes atenuantes das injúrias decorrentes. Contudo, a maioria dos estudos tem sido realizada em amostras de plasma ou soro (JONAS, 2000; JONES, 2002; MORIARTY, 2003; ASHFAQ, 2006) ou em leucócitos (GALLI, 2007). Entretanto, mais recentemente, tem-se demonstrado a indução de estresse oxidativo em cultura de células (WERNECK, 2006; GÜNTNER, 2009).

Um dos grandes desafios dos pesquisadores atuais tem sido estabelecer se o estresse oxidativo contribui com o risco de doença cardiovascular em pacientes com doença renal crônica ou se exerce papel direto na perda da função renal (MARTIN, 2007; CARBO, 2008; HIMMELFARB, 2009). Sendo a uremia um estado caracterizado por grande produção de agentes oxidantes e uma queda da reserva antioxidante, sugere-se que os rins exercem papel direto na modulação da química redox e atenuante do estresse oxidativo sistêmico, característicos em doentes renais crônicos (MATSUYAMA, 2009; HIMMELFARB, 2009). Excesso de pró-oxidantes ou radicais podem alterar macromoléculas, que incluem proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, resultando em subsequente dano celular e tecidual (SAGAR, 2008; GÜNTNER, 2009; MATSUYAMA, 2009; HIMMELFARB, 2009). Este trabalho procurou estabelecer a ligação entre a uremia e o seu papel em distúrbios vasculares oxidativos, bem como o papel do antioxidante N-acetilcisteína no tratamento de danos ocasionados por ROS e RNS, particularmente em cultura de células endoteliais e musculares lisas de aorta de rato perante o tratamento com

soro de doentes renais crônicos, estágio 5, coletado e caracterizado segundo sua toxicidade (TABELA 4).

Além de a doença renal crônica ser indicada como um estado pró-oxidante, caracterizado pelos elevados níveis de marcadores de estresse oxidativo no soro, foi obtido resultados relativos à produção e origem de ROS e RNS, envolvidos no mecanismo de ativação celular pela uremia. A investigação direcionada ao papel da uremia em células vasculares visou identificar moléculas específicas que se acumulam excessivamente neste cenário e contribuem para agressões vasculares.

Este estudo demonstrou que o soro urêmico foi capaz de aumentar os níveis do ânion superóxido em células endoteliais e musculares lisas com 3 e 24 horas de exposição. Isto pode estar relacionado ao fato de toxinas urêmicas acumuladas no soro influenciarem as fontes de produção intracelulares deste ânion. Sendo assim, tal superprodução pode ser consequência da ativação do complexo Nox (NADPH oxidase), uma vez que a queda na produção de superóxido por apocinina, um inibidor característico da atividade NADPH oxidase (HEUMÜELLER, 2010), teve influência na queda da produção de superóxido frente ao soro urêmico. Entretanto, este estudo também demonstrou que o superóxido derivado da uremia pode também ser proveniente da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que ocorreu aumento significativo na produção deste ânion em 24 horas de tratamento em ambos os tipos celulares. O ânion superóxido é o radical mais relevante formado *in vivo* pela redução do oxigênio molecular em indivíduos portadores de doença renal crônica (SAGAR, 2008; GÜNTHER, 2009; MATSUYAMA, 2009; HIMELFARB, 2009).

As NADPH oxidases são complexos enzimáticos ligados à membrana que participam de vários eventos celulares por serem importante origem de ROS. Sendo

assim, é considerada significativa contribuinte em eventos relacionados ao estresse oxidativo, uma vez que a produção excessiva de espécies reativas pela NADPH oxidase participa processos de sinalização celular tanto em condições fisiológicas, como o *burst* respiratório durante processos de ativação leucocitária (GALLI, 2007), como em condições patológicas (KUMAGAI, 2009; WOSNIAK JR., 2009; HEUMÜELLER, 2010) ocasionando consequentemente danos teciduais, principalmente em doenças inflamatórias (HIMMELFARB, 2004; GALLI, 2007; HEUMÜELLER, 2010). Além disso, atividades da cadeia transportadora de elétrons e outras enzimas da mitocôndria também originam ROS intracelulares, que também contribuem com processos de sinalização redox. Entretanto, a doença renal crônica envolve disfunção mitocondrial, levando a distúrbios no metabolismo energético, na homeostase de cálcio e, particularmente, na produção de ROS (KUMAGAI, 2009; WOSNIAK JR., 2009; HEUMÜELLER, 2010). Neste trabalho, foi verificado que a produção de superóxido mitocondrial em células endoteliais e musculares lisas mostrou-se influenciada perante 24 horas de exposição ao soro urêmico.

Assim, nossos dados mostram a possibilidade de que a produção de superóxido, ligada à uremia, pode ser resultado da relação cruzada entre caminhos sinalizadores provenientes da NADPH oxidase e da mitocôndria. Alguns caminhos que afetam a NADPH oxidase fazem parte de processos fisiológicos como adaptações metabólicas, apoptose, diferenciação e sinalização celular em resposta a um pequeno estresse, que também são vistos em disfunção mitocondrial em baixo grau (DI MARCO, 2008; KUMAGAI, 2009; WOSNIAK JR., 2009).

Já foi relacionado que altos níveis de uréia no soro podem contribuir com o acúmulo de H_2O_2 em tecidos de pacientes renais crônicos (MASSY, 2009). Este fato foi comprovado ao quantificar os níveis de H_2O_2 em células vasculares em cultura

quando tratadas com soro urêmico. Foi demonstrado que células endoteliais e musculares lisas apresentaram certa tendência de acumular H_2O_2 após 24 horas de tratamento, sendo a oxidação do DCFH-DA quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado.

Além dos peroxissomos, outra fonte de peróxido de hidrogênio pode ser o próprio ânion superóxido, convertido pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou mesmo espontaneamente, em caso de estresse (VALKO, 2007). Foi demonstrado que os níveis de peróxido de hidrogênio, como o ânion superóxido, tendem a aumentar com o passar do tempo quando expostos ao soro urêmico, confirmando o fato de a uremia contribuir com o desenvolvimento de estresse oxidativo quando está em contato com células e tecidos.

O óxido nítrico (NO) constitui um dos mais importantes mensageiro-moduladores em diversos processos biológicos essenciais. No entanto, é potencialmente tóxico, particularmente em situações de desequilíbrio (BRYAN, 2009). Alterações no sistema NO tem sido implicadas na contribuição de algumas condições patológicas relacionadas ao estresse nitroxidativo, como asma, lesões ateroscleróticas e vasculares (THURASINGHAM, 2002). Dentro de um contexto urêmico, os resultados obtidos demonstraram que a liberação de NO esteve aumentada em células endoteliais e musculares lisas durante 3 horas de exposição, indicados pela reação de NO produzido com DAF-2DA. Este aumento foi mais evidente em células endoteliais, provavelmente pelo fato de a eNOS estar estrategicamente presente na membrana dessas células e aumentar sua expressão em resposta a agentes agonistas urêmicos presentes no soro (KUMAGAI, 2009). Em 24 horas de exposição, ocorreu uma elevação significativa dos níveis de NO, em ambos os tipos celulares, somente perante o soro não urêmico. Este fato sugere que

o soro urêmico, nesse tempo, deve estar começando a afetar a biodisponibilidade do NO, que pode estar ligada ao desenvolvimento de aterogênese em doentes renais crônicos (ASHFAQ, 2006).

A nitração de proteínas tem sido avaliada como um potencial indicador de estados agudos e crônicos de doenças. O processo de nitração é mediado por sistemas oxidantes enzimáticos e não enzimáticos como o peroxinitrito, peroxidases/peróxido de hidrogênio/nitrito e hemeproteínas, como a ciclo-oxigenase-2 e a iNOS (VAZ, 2007). A reação entre NO e ânion superóxido resulta na formação de peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso modificador de proteínas (NAKATSUBO, 1998). O ONOO^- pode ser protonado a ácido peroxinitroso e se decompor em NO_2 e radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), altamente reativo e tóxico (NAKATSUBO, 1998; THURAISINGHAM, 2002; KUMAGAI, 2009). A formação de peroxinitrito leva a uma extensiva modificação nitrativa e oxidativa de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Medidas de aminoácidos nitrados podem ser utilizadas como excelente marcador de estresse nitroxidativo em células e tecidos pelo fato de serem relativamente estáveis quando comparadas a medidas diretas de NO, um radical livre transitório (HIMMELFARB, 2009). Estes subprodutos, como a 3-nitrotirosina, acumulam-se em rins fibróticos bem como no soro de pacientes com doença renal crônica, sugerindo que o estresse oxidativo aumenta durante a progressão da doença (HIMMELFARB, 2009). Células endoteliais aparecem como maior alvo e onde o papel patogênico de peroxinitrito tem sido sugerido na síndrome urêmica hemodialítica e sua associação com outras etiologias (ANTOLIN, 2001).

Sendo as reações químicas redox mediadas por RNS instáveis, faz-se da utilização de seus produtos finais, moléculas mais estáveis, formas de medidas indiretas dos níveis de espécies reativas provenientes de NO. Um marcador que tem

sido bastante utilizado é a 3-nitrotirosina sobre os resíduos tirosina das proteínas (THURASINGHAM, 2002; KUMAGAI, 2009), proveniente da ação de peroxinitrito e peroxidases, devido à disponibilização de anticorpos comerciais que possibilitam sua detecção sensível em amostras biológicas. Como a produção de NO em células vasculares em cultura mostrou-se aumentada em 3 horas de exposição ao soro urêmico, foi verificado se neste tempo o soro urêmico já provocaria a nitração de proteínas nessas células. Através do ensaio de imunofluorescência, foi verificado que em 3 horas já existe a leve presença de proteínas nitradas e que em 24 horas mostraram-se notavelmente presentes. Esses resultados mostram que as diferenças na produção e bioatividade de NO pode estar relacionado ao aumento no consumo de NO na uremia, resultando em um aumento na produção de peroxinitrito e seus derivados (KUMAGAI, 2009). Este produto sozinho é um potente agente oxidante, que tem sido mostrado presente em placas ateroscleróticas em pacientes não urêmicos e, portanto, tem sido implicado em doenças vasculares (THURASINGHAM, 2002). Resultados recentes mostraram uma imunomarcacão para nitrotirosina consistentemente mais intensa em artérias de pacientes renais do que em artérias de pacientes saudáveis (WERNECK, 2006). Outro dado importante foi de que a oxidação da albumina (que pode ser considerada também um marcador de estresse oxidativo) e a carbonilação de proteínas aumenta progressivamente com o avanço dos estágios da doença crônica progressiva (MATSUYAMA, 2009).

Níveis plasmáticos de biomarcadores de estresse oxidativo como níveis de tióis, produtos de peroxidação lipídica, níveis de proteínas oxidadas e resíduos de aminoácidos modificados, são todos referências de estresse oxidativo sistêmico. A carbonilação é um processo pelo qual grupos tióis e grupos aminos são modificados como resultado de reações com cianato derivado de uréia, sendo assim, é um

estado aumentado na doença renal crônica (YOUNG, 1998). Grupos carbonilas têm sido utilizados como marcadores de atividade pró-oxidante, pois estudos demonstram um progressivo aumento em radicais carbonilas nos indivíduos em hemodiálise quando comparados aos saudáveis (AVELES, 2010, 2008; MATSUYAMA, 2009; HIMMELFARB, 2009). Estes produtos da carbonilação induzida pela uremia foram determinados neste trabalho de uma forma tempo-dependente, em RAECs e RASMs expostas ao ambiente urêmico. Foi possível verificar um aumento na marcação de carbonilas em 3 horas de tratamento tanto em ambos os tipos celulares, sendo esse aumento significativo em RAEC em 24 horas de exposição, observou-se um aumento significativo em RAEC. A formação de carbonilas em lipídios, carboidratos e proteínas pode ser resultado de reações oxidativas provenientes de outros caminhos bioquímicos não enzimáticos no acúmulo em longo prazo de toxinas urêmicas (MATSUYAMA, 2009), o que justifica a importância desse estudo ao demonstrar a relação entre estresse nitroxidativo e a carbonilação de proteínas em células vasculares tratadas com soro de pacientes renais crônicos em hemodiálise.

Vários sistemas antioxidantes intra e extracelulares são envolvidos na destoxificação de radicais livres e outros oxidantes. Proteínas tióis e tióis de baixa massa molecular fazem parte de um importante sistema de defesa antioxidante. Neste trabalho foi possível observar que o aumento na carbonilação de proteínas intracelulares em células vasculares foi acompanhada por uma diminuição simultânea dos níveis de tióis.

Reações de proteínas que contém grupos tióis é um importante mecanismo pelo qual o estado redox celular está integrado a caminhos de transdução de sinais. Os mais importantes pares tiol/dissulfeto são GSH/GSSG, tioredoxina e outras

proteínas que contêm cisteínas (R-Cys/R-CySS) (LEICHERT, 2006; JONES 1998; SHAIK, 2006). Os efeitos crônicos da uremia no sistema de defesa antioxidante de células endoteliais e musculares lisas foram investigados pela determinação da razão de GSHtotal/GSSG após 3, 6 e 24 horas de tratamento. Comparado ao soro não urêmico, foi observado uma diminuição nessa razão, indicando uma queda na defesa antioxidante e um favorecimento do produto oxidado. A diminuição de GSH durante o tratamento com soro de pacientes em diálise aponta para um consumo ou uma perda de GSH durante a terapia de diálise, indicando mais um alvo da uremia (SCHETTLER, 1998).

Antioxidantes intracelulares, como a glutathiona, são doadores de elétrons, que neutralizam ROS e RNS. Glutathiona oxidada representa um segundo mensageiro que pode estar envolvido na regulação da expressão de genes (SCHETTLER, 1998; SHAIK, 2006; HANDY, 2009) relacionados a elementos de resposta antioxidante como, por exemplo, o NRF2 (CHEN, 2006). Estes resultados, aliados a trabalhos recentes publicados sobre a metodologia, estendem sua aplicação a sistemas vasculares como um importante direcionamento para terapia antioxidante *in vivo*. Como a falha da função renal está associada à significativa diminuição de importantes antioxidantes, é provável que a produção de radicais livres seja particularmente prejudicial neste contexto (YOUNG, 1998; HIMMELFARB, 2009). Sendo assim, muitas intervenções farmacológicas têm sido experimentadas a fim de providenciar proteção renal aos danos ocasionados pelo estresse nitroxidativo. A N-acetilcisteína (NAC) vem sendo apontada como um agente atenuante de doenças sistêmicas como a insuficiência renal crônica, através de diferentes efeitos antiinflamatórios e antioxidantes (SAGAR, 2008; NIGWEKAR, 2008; NOLIN, 2010). Efeitos antioxidantes de NAC puderam ser observados neste

estudo, uma vez que reduziu a produção de superóxido, semelhantemente à apocinina, a produção de peróxido de hidrogênio, de óxido nítrico e seus efeitos como a nitração de proteínas em células pré-tratadas durante 24 horas. Estes resultados sugerem que a administração de NAC é significativamente importante na redução de ROS e RNS causadas pela queda na taxa de filtração glomerular, ou seja, é potencialmente útil na prevenção tanto de produção de ROS/RNS como na produção dos danos oxidativos causados pela uremia. Vários estudos vêm sendo focados na aplicação de NAC e seus efeitos benéficos propostos para regular a atividade relacionada ao estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica (MASSY, 2009).

NAC com seus efeitos pleiotrópicos, como neutralização de radicais de oxigênio e vasodilatação mediada pelo endotélio, é visto como um promissor agente terapêutico direcionado a conter complicações decorrentes da uremia (SAGAR, 2008). Além disso, tem contribuído para a melhora na definição e no uso de terapias antioxidantes, talvez direcionado para inibição da origem específica de ROS e RNS, a fim de retardar o curso da doença vascular em doença renal crônica (MARTIN, 2007).

NAC possui alta capacidade antioxidante por ser estimulante da síntese de glutathione reduzida frente ao estresse nitroxidativo, além de realizar a manutenção dos níveis intracelulares da síntese de glutathione e de moléculas captadoras de ROS (CAYLAK, 2007; NOLIN, 2010). Estudos têm demonstrado efeitos atenuantes de NAC na taxa de filtração glomerular e queda na proteinúria na doença renal crônica tardia (TUMUR, 2010,). Os efeitos do NAC em pacientes renais em hemodiálise também têm sido verificados, principalmente quanto à redução do risco de disfunção cardiovascular (CHEN, 2002; MASSY, 2009). Além disso, é evidentemente mostrado

no combate a danos ocasionados por outras enfermidades como câncer, infecções causadas por HIV e toxicidade induzida por metais (MOIST, 2010). NAC também tem sido considerado um importante agente benéfico em disfunções endoteliais, inflamação sistêmica e fibrose, principalmente por antagonizar efeitos da formação de moléculas reativas intracelulares (NOLIN, 2010).

De uma forma geral, podemos sugerir que as toxinas urêmicas, como citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-6), proteína “C” reativa, fosfato inorgânico, indoxil sulfato (BARRETO, 2009) induzem ativação de NADPH oxidase, assim como uma disfunção mitocondrial, principalmente após 24h de tratamento, nas células vasculares, promovendo a produção de superóxido. Também ativa a produção de NO, e este, na presença de superóxido, produziria peroxinitrito, responsável por provocar um aumento no processo de nitração em resíduos de tirosina em proteínas intracelulares, principalmente em células expostas à toxicidade urêmica no período de 24 horas. A carbonilação também se mostrou aumentada nessas células, sendo equivalente ao desequilíbrio demonstrado no par redox intracelular GSHtotal/GSSG, em favor da forma oxidante. De fato, estes biomarcadores já foram empregados em diversos estudos para demonstrar que a doença renal crônica, principalmente nos estágios finais, está intimamente associado ao estresse nitroxidativo (HIMMELFARB, 2009; VAZIRI, 2004; MASSY, 2009). Além disso, os resultados obtidos neste trabalho apontam o efeito neutralizante do NAC em cima de radicais reativos de oxigênio e nitrogênio originados por indução às toxina urêmicas presentes no soro de doentes renais crônicos, sendo visto como um promissor agente terapêutico direcionado a conter complicações decorrentes da uremia.

6 CONCLUSÃO

Nos últimos anos, a doença renal crônica tem sido identificada como um grave problema de saúde mundial (GÜNTNER, 2009; HIMMELFARB, 2009). Sendo assim, pesquisas atuais estão sendo desenvolvidas a fim de identificar moléculas específicas que se acumulam excessivamente, em longo prazo, nos fluidos corporais quando ocorre queda na taxa de filtração glomerular (HIMMELFARB, 2009).

Células vasculares (endoteliais e musculares lisas) têm sido alvo de muitos estudos por serem as primeiras a sentir as variações de toxinas urêmicas acumuladas no plasma de portadores de doença renal crônica e poderem responder inicialmente pela modulação de suas funções (DI MARCO, 2008). Assim, foi observado neste trabalho que o soro urêmico foi capaz de induzir estresse nitroxidativo em células endoteliais e musculares lisas de aorta de rato em cultura devido ao aumento na produção de superóxido e óxido nítrico em um período de 3 e 24 horas. Além disso, foi verificado também que ocorreu um desequilíbrio na par redox intracelular GSHt/GSSG em favor da forma oxidada, comprovando que essas células quando expostas ao ambiente urêmico em poucas horas já passam a sofrer injúria. Isto pode ser comprovado através da marcação de carbonilação e nitração de proteínas em três horas de exposição ao soro urêmico.

Além disso, este estudo demonstrou a proteção do antioxidante N-acetilcisteína contra o estresse oxidativo em células vasculares induzido por toxinas acumuladas no soro de doentes renais. Em resumo, nossos dados demonstraram que NAC atenuou a produção de ROS e RNS. Estes efeitos foram acompanhados por significantes diminuições na produção de carbonilas e proteínas nitradas, que

em acúmulo podem levar à danos celulares e, conseqüentemente, teciduais. Este fato comprova que o NAC é potencialmente útil na prevenção de estresse nitroxidativo presente em células vasculares decorrente da uremia.

REFERÊNCIAS

ANDREOLI, T.E.; CARPENTER, C.C.J.; GRIGGS, R.C.; LOSCALZO, J. Cecil – **Medicina interna básica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. Oficina de Textos, São Paulo, 2006.

ASHFAQ, S.; ABRAMSON, J.L.; JONES, D.P.; RHODES, S.D.; WEINTRAUB, W.S.; HOOPER, W.C.; VACCARINO, V.; HARRISON, D.G.; QUYYUMI, A.A. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, p.1005-1011, 2006.

AVELES, P.R.; CRIMINÁCIO, C.R.; GONÇALVES, S.; BIGNELLI, A.T.; CLARO, L.M.; SIQUEIRA, S.S.; NAKAO, L.S.; PECOITS-FILHO, R.P. Association between Biomarkers of Carbonyl Stress with Increased Systemic Inflammatory Response in Different Stages of Chronic Kidney Disease and after Renal Transplantation. **Nephron Clinical Practice**, v.116, n.4, p. 229-294, 2010.

BALLATORI, N.; KRANCE, S.M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C.L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v.390, n. 3, p. 191-214, 2009.

BARRETO, F.C.; BARRETO, D.V.; LIABEUF, S.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; TEMMAR, M.; CHOUKROUN, G.; VANHOLDER, R.; MASSY. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 10, p. 1551-8, 2009.

BERGER M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 24, p.172–183, 2005.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; NETO, M.A.; VERCESI, J.A.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L. M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling of nitric oxide synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.103, n 10, p.1366-74, 2009.

BRENNER, B.M. Brenner and Rector's The Kidney. 8ª ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2008.

BRYAN, N.S. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? a systems-based review. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n.5, p.691-701, 2006.

CANTIN, A.M., Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.10, p.531–536, 2004.

CARBÓ, C.; ARDERIU, G.; ESCOLAR, G.; FUSTÉ, B.; CASES, A.; CARRASCAL, M.; ABIÁN, J.; DÍAZ-RICART, M. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. **American J Kidney Dis.** v. 51, n. 4. p.603-12, 2008.

CHAN, K.; HAN, X. D. O.; WAI KAN, Y. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. **Medical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4611–4616, 2001.

CHEIDA, L.E. **Biologia Integrada**. São Paulo: Ed FTD, 2002.

CHEN, N. X.; O'NEILL, K. D.; DUAN, D.; MOE, S. M. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. **Kidney International**, v.62, n.5, p.1724-31, 2002.

CHEN, X. L.; DODD, G.; THOMAS, S. U.; ZHANG, X.; WASSERMAN, M. A.; ROVIN, B. H.; KUNSCH, C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. **AJP - Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, p. 1862-1870, 2006.

CLERMONT, G.; LECOUR, S.; LAHET, J.-J.; SIOHAN, P.; VERGELY, C.; CHEVET, D.; RIFLE, G.; ROCHETTE, L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovascular Research Center bulletin**, v. 47, p. 618-623, 2000.

CUPERUS, R.; LEEN, R.; TYTGAT, G.A.; CARON, H.N.; VAN KUILENBURG, A.B. Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p. 618-623, 2000.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23-38, 2003.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; CRUEKE, T.; WITKO-SARSAT, V; Dialysis-induced oxidative stress: Biological aspects, clinical consequences and therapy. **Seminars in Dialysis**, v.14, n.3, p.193-199, 2001.

DI MARCO, G.S.; HAUSBER, G. M.; HILLEBRAND, U.; RUSTEMEYER, P.; WITTKOWSKI, W.; LANG, D.; PAVENSTÄDT, H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **American Journal Physiology. Renal Physiology**, v. 294, n.6, p. 1381-7, 2008.

DIKSHIT, M.; SHARMA, P. Nitric Oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: A flowcytometric study. **Methods in Cell Science**, v.24, p. 69-76, 2002.

DROGE, W.; Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Research**, v.82, p.47-95, 2002.

DUIJVESTIJN Y.C.; BRAND, P.L. Systematic review of N-acetylcysteine in cystic fibrosis. **Acta Paediatrica**, v.88, p. 38-41, 1999.

GALLI, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Supl, I.5, v.22, p.20-36, 2007.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathionedisulfide using glutathione reductase and 2-vinilpiridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207 – 212, 1980.

GOODMAN, G.E.; THORNQUIST, M.D.; BALMES, J.; CULLEN, M.R.; MEYSKENS, F.L. JR; OMENN, G.S.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J.H. JR. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, p.1743-1750, 2004.

GÜNTHER, T.; JANKOWSKI, V.; KRETSCHMER, A.; NIERHAUS, M.; VAN DER GIET, M.; ZIDEK, W.; JANKOWSKI, J. Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia. **Seminars Dialysis**, v. 22, n.4, p. 428-32, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6ª Edição, Guanabara Koogan, 1998.

HAN, Z.; VARADHARAJ, S.; GIEDT, R.J.; ZWEIER, J.L.; SZETO, H.H.; ALEVRIADOU, B.R. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate heme oxygenase-1 expression in sheared endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.329, n.1, p.94-101, 2009.

HERRERA, M.; SILVA, G.B.; GARVIN, J.L. Angiotensin II stimulates thick ascending limb superoxide production via protein kinase C(alpha)-dependent NADPH oxidase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.28, p.21323-8, 2010.

HEUIL, D.J. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 5, p. 676-84, 2002.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA, S, E.; SCHMIDT, H,H.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R, P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**. V.51. n. 2 p. 207-11. 2007.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney International**, v.58, p.2571-2578, 2000.

HIMMELFARB, J.: Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? **Seminars in Dialysis**. v. 17, n. 6, p. 449-54, 2004.

HIMMELFARB, J. Uremic Toxicity, Oxidative Stress, and Hemodialysis as Renal Replacement Therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 6, p. 636 – 643, 2009.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; ENGEL, J. D.; YAMAMOTO, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & Development**, v. 13, p. 76-86, 1999.

JONAS, C.R.; PUCKETT, A.B.; JONES, D.P.; GRIFFITH, D.P.; SZESZYCKI, E.E.; BERGMAN, G.F.; FURR, C.E.; TYRE, C.; CARLSON, J.L.; GALLOWAY, J.R.; BLUMBERG, J.B.; ZIEGLER, T.R. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p.181-189, 2000.

JONES, D.P.; MODY, V.C.; CARLSON, J.L.; LYNN, M.J.; STERNBERG, P. JR. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, p.1290-1300, 2002.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9 & 10, p. 1865 – 1879, 2006.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. NADPH oxidase activity in vascular systems. **American journal of physiology. Cell physiology**. v. 295, p.849-868, 2008.

KEMP, M.; GO, Y.M.; JONES, D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 6, p. 921-37, 2008.

KLEINMAN, W.A.; RICHIE, J.P.; Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. **Biochemical pharmacology**, v. 60, p. 19-29, 2000.

KOLAGAL, V.; KARANAM, S.A.; DHARMAVARAPU, P.K.; D'SOUZA, R.; UPADHYA, S.; KUMAR, V.; KEDAGE, V.; MUTTIGI, M, S.; SHETTY, J, K.; PRAKASH, M. Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. **Indian Journal Nephrology**, v.19, n.1, p.8-12, 2009.

KUMAGAI, R.; LU, X.; KASSAB, G, S Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, n. 5, p. 600-7, 2009.

LAHERA, V.; GOICOECHEA, M.; VINUESA, S.G. de; OUBIÑA, P.; CACHOFEIRO, V. CAMPDERÁ, F.G.; AMANN, R.; LUÑO, J. Oxidative Stress in Uremia: The Role of Anemia Correction. **Journal of the American society of Nephrology**, v.17, p. S174-S177, 2006 .

LEICHERT, L.I.; JAKOB, U. Global methods to monitor the thiol-disulfide state of proteins in vivo. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.5 e 6, p.763-772, 2006.

LEVEY, A.S.; ECKARDT, K.; TSUKAMOTO, Y.; LEVIN, A.; CORESH, J.; ROSSERT, J.; ZEEUW, D.; HOSTETTER, T.H.; LAMEIRE, N.; EKNOYAN, G. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney International**, v.67, p.2089-2100, 2005.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARTD, K.U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, p.1272-1280, 2003.

LONN, E.; BOSCH, J.; YUSUF, S.; SHERIDAN, P.; POGUE, J.; ARNOLD, J.M.; ROSS, C.; ARNOLD, A.; SLEIGHT, P.; PROBSTFIELD, J.; DAGENAIS, G.R.; HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. **Journal of American Medical Association**, v.293, p.1338-1347, 2005.

SAN MARTIN A, FONCEA R, LAURINDO FR, EBENSPERGER R, GRIENDLING KK, LEIGHTON F. Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p.1671-1679, 2007.

MASSY, Z.A.; STENVINKEL, P.; DRUEKE, T.B.; The Role Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Seminars in Dialysis**, v.22, n.4, p. 405-408, 2009.

MATSUYAMA Y, TERAOKA H, TERADA T, ERA S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. **Clinical and experimental Nephrology**, v.13, n.4, p.308-15, 2009.

MCMENAMIN, M.E.; HIMMELFARB, J.; NOLIN, T.D. Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Analytical**, v. 877, p. 3274-3281, 2009.

MIYATA, T.; IZUHARA, Y.; SAKAI, H.; KUOKAWA, K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. **Peritoneal dialysis international**, v.19, n. 2, p. S58-61, 1999.

MOIST, L.; SONTROP, J, M.; GALLO, K.; MAINRA, R.; CUTLER, M.; FREEMAN, D.;HOUSE, A, A. Effect of N-Acetylcysteine on Serum Creatinine and Kidney Function: Results of a Randomized Controlled Trial. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 20, n. 10, p. 30, 2010.

MORIARTY, S.E.; SHAH, J.H.; LYNN, M.; JIANG, S.; OPENO, K.; JONES, D.P.; STERNBERG, P. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, n.12, p.1582-8, 2003.

NAKATSUBO, N.; KOJIMA, H.; KIKUCHI, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; MAEDA, D.; IMAI, Y.; IRIMURA, T.; NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Lett.** v. 427, n. 2, p. 263-6, 1998.

NAVARRO-ANTOLÍN, J.; LÓPEZ-MUÑOZ, M.J.; KLATT, P.; SORIA, J.; MICHEL, T.; LAMAS, S. Formation of Peroxynitrite in Vascular Endothelial Cells Exposed to Cyclosporine A. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 7, p. 1291-3, 2001

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3ªEd. São Paulo: Sarvier, 2002.

NGUYEN, T.; YANG, C. S.; PICKETT, C. B. The Pathways and Molecular Mechanisms Regulating Nrf2 Activation in Response to Chemical Stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 4, p. 433 – 441, 2004.

NICOLIS, S.; PENNATI, A.; PERANI, E.; MONZANI, E.; SANANGELANTONI, A.M.; CASELLA, L. Easy Oxidation and Nitration of Human Myoglobin by Nitrite and Hydrogen Peroxide. **Chemistry**, v.12, n.3, p.749-57, 2006.

NIGWEKAR, S. U.; KANDULA, P. N-Acetylcysteine in Cardiovascular-Surgery-Associated Renal Failure: A Meta- Analysis. **Society of Thoracic Surgeons**, v.87, p.139-147, 2009.

NIWA, T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. **Nagoya Journal of Medical Science**, v.72, n.1-2, p.1-11, 2010.

NOLIN, T.D.; MCMENAMIN, M. E.; HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.852, n.1-2, p.554-561, 2007.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v.24, n.1311-1317, 2005.

ORRELL, R.; LANE, R.; ROSS, M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.9, n.4, p.195-211, 2008.

PREMAOR, M.O.; FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.1, p.25-37, 2006.

QUIJANO, C.; CASTRO, L.; PELUFFO, G.; VALEZ, V.; RADI, R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.293, n. 6, p.3404-14, 2007.

QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. **England: Oxford University Press**, p. 257-258, 2000.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature**, v.1, p. 3159-3165, 2007.

ROBINSON, I.; DE SERNA, D.G.; GUTIERREZ, A.; SCHADE, D.S. Vitamin E in humans: an explanation of clinical Trial failure. **Endocrine Practice**, v.12, p.576-582, 2006.

ROMÃO, J.E.; Doença renal crônica: Definição, epidemiologia e classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.3, n.1, p.1-3, 2004.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free radical biology & medicine**, v.30, p.1191-1212, 2001.

SCHETTLER, V.; WIELAND, E.; METHE, H.; SCHUFF-WERNER, P.; MÜLLER, G.A.; Oxidative stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 2588-2593, 1998.

SERRADELL, M.; DIAZ-RICART, M.; CASES, A.; ZURBANO, M.J.; LOPEZ-PEDRET, J.; ARRANZ, O.; ORDINAS, A.; ESCOLAR, G. Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. **Haematologica**, v.87, n.10, p.1053-61, 2002.

SERRADELL, M.; DIAZ-RICART, M.; CASES, A.; PETRIZ, J.; ORDINAS, A.; ESCOLAR, G. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, p.1079-1085, 2003.

SHAIK, I.H.; MEHVAR, R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 1, p.105-113, 2006.

SHIMIZU, M.H.; DANILOVIC, A.; ANDRADE, L.; VOLPINI, R.A.; LIBÓRIO, A.B.; SANCHES, T.R.; SEGURO, A.C. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 10, p. 3067-73, 2008.

SIES, H. Biological redox systems and oxidative stress. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**. v. 64, p. 2181-2188, 2007.

STOCKER, R., KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Review**, 84, p.1381-1478, 2004.

SILVEIRA, L.R.; HIRABARA, S.M. LAMBERTUCCI, R.H.; LEANDRO, C.V.; FIAMONCINI, J.; PINHEIRO, C.H.J.; D'ANGELO, A.C.A.; BASSIT, R.A.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Regulação Metabólica e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Durante a Contração Muscular: Efeito do Glicogênio na Manutenção do Estado Redox Intracelular. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, n.1, p.57-63, 2008.

TERASHIMA, M.; INOUE, N.; OHASHI, Y.; YOKOYAMA, M. Relationship between coronary plaque formation and NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species - comparison of intravascular ultrasound finding of atherosclerotic lesions with histochemical characteristics. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v.53 n.3 p.107-17, 2007.

THURASINGHAM, R.C.; ROBERTS, N.B.; WILKES, M.; NEW, D.I.; MENDES-RIBEIRO, A.C.; DODD, S.M.; YAQOOB, M.M. Altered L-arginine metabolism results in increased nitric oxide release from uraemic endothelial cells. **Clinical Science (Lond)**, v. 103, n. 1, p. 31-41, 2002.

THURASINGHAM, R.C.; YAQOOB, M.M. Oxidative consumption of nitric oxide: a potential mediator of uremic vascular disease. **Kidney International**, v.63, n. 84, p.29-32, 2003.

TUMUR, Z.; SHIMIZU, H.; ENOMOTO, A.; MIYAZAKI, H.; NIWA, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **American Journal Nephrology**, v.31, n. 5, p. 435-41, 2010.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology** v. 39, p.44-84, 2007.

VAZ, S.M.; AUGUSTO, O. Inhibition of Myeloperoxidase-Mediated Protein Nitration by Tempol: Kinetics, Mechanism and Implications. **Proceedings of the National Academy of SCI USA**, v.105, n.24, p. 8191-6, 2008.

VAZIRI, N.; NI, Z.; OVEISI, F.; LIANG, K.; PANDIAN, R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. **Hypertension**, v. 39, p.135-141, 2002.

VAZIRI, N.D., DICUS, M., HO, N.D., BOROUJERDI, L., SINDHU, R.K. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. **Kidney International** v. 63, p. 179-185, 2003.

VAZIRI, ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.13, p.93-99, 2004.

VINA, J., LLORET A., ORTI R., ALONSO D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine**, 25, p.117–123, 2004.

XIAO. S.; WAGNER, L.; MAHANEY, J.; BAYLIS, C. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.280, p.989-995, 2001.

WERNECK, M.L., FRANÇA, K, FORTES, P.C.N, AVELES, P., FERNANDES, D., LAURINDO, F.R., PECOITS-FILHO, R., NAKAO, L.S. Increased reactive oxygen species formation in endothelial cells induced by uremic serum. **Journal American Society of Nephrology**. v. 17, p. 27A, 2006.

WILLIAMS, K.J.; FISHER, E.A. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.8, p.139-146, 2005.

WOSNIAK, J, JR.; SANTOS, C,X.; KOWALTOWSKI, A,J.; LAURINDO, F,R. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, n. 6, p.1265-7. 2009.

YAO, Q., PECOITS-FILHO, R., LINDHOLM, B., STENVINKEL, P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. . **Journal American Society of Nephrology**, v. 38, p. 405-416, 2004.

YOH, K.; HIRAYAMA, A.; ISHIZAKI, K.; YAMADA, A.; TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S.; MORITO, N.; NAKANO, T.; OJIMA, M.; SHIMOHATA, H.; ITOH, K.; TAKAHASHI, S.; YAMAMOTO, M. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. **Genes to Cells**, v. 13, p. 1159-1170, 2008.

YOUNG, I.S.; HASSELWANDER, O. Oxidative stress in chronic renal failure. **Free Free Radical Research**, v.29, p. 1-11, 1998.

ZAFARULLAH, M.; LI, W.Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 6-20, 2003.

ZHAO, H.; JOSEPH, J.; FALES, H.M.; SOKOLOSKI, E.A.; LEVINE, R.L.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.16, p.5727-5732, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, _____ anos, portador do RG _____, manifesto aqui meu consentimento em participar da pesquisa intitulada **"Avaliação da indução de estresse nitroxidativo e da ativação das vias Nrf2 e Runx2 por soro urêmico em células musculares lisas vasculares"**, sob responsabilidade da Dra. Lia S. Nakao, professora e pesquisadora do Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Geral, Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Estou ciente de que:

- (i) Tal pesquisa poderá abrir novas perspectivas quanto ao entendimento da evolução de doenças vasculares associadas à doença renal crônica, e que a utilização do meu sangue poderá beneficiar outras pessoas a um médio-longo prazo;
- (ii) O sangue será coletado de uma veia de meu antebraço por profissional habilitado e a quantidade coletada (5-10 ml) não causará repercussão sobre meu estado de saúde, gerando apenas o desconforto na hora da coleta;
- (iii) Poderei a qualquer momento (desde o início até ao final da pesquisa, ie, agora até a publicação do artigo científico) solicitar esclarecimentos sobre a pesquisa;
- (iv) Tenho a liberdade de recusar-me a participar ou retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo;
- (v) Minha privacidade está garantida quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
- (vi) Estou doando, e não vendendo, meu sangue, e portanto, não receberei dinheiro por tal ato.

Estando de acordo com tal termo, firmo aqui,

Nome, data e assinatura _____

ANEXO 2 - FICHA DE ANAMNESE

FICHA DE ANAMNESE**DADOS PESSOAIS:**

Data :

Nome :

Sexo :

Data Nasc:

Endereço :

Profissão :

Nacionalidade:

Motivo da Visita :

SAÚDE GERAL:

1. Durante os últimos 2 anos recebeu algum tratamento médico?
2. Em que especialidade?
3. Já teve hospitalizado? Quando? Quanto tempo? Porque?
4. Toma medicamentos? Quais?
5. Costuma sangrar muito quando se machuca? Demora em cicatrizar?
6. Você fuma?
7. Toma bebidas alcoólicas freqüentemente?
8. Costuma sentir tontura ou ter desmaio?
9. Teve alguma doença infecciosa ou alguma das doenças abaixo, nos últimos três meses?
 - Problemas cardíacos
 - Pressão alta
 - Anemia
 - Hepatite
 - Diabetes
 - Epilepsia
 - Reumatismo
 - Problemas nervosos
 - Hepático
 - Respiratório
 - HIV
 - Outras

TERMO DE RESPONSABILIDADE:

Estou ciente e de acordo com todas as informações acima relacionadas.

Local e Data

Assinatura Paciente